



IPW

Atty. Dkt. No. 081356-0207

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant: Eiji MORI, et al.

Title: ANTI-TRAIL-R ANTIBODY

Appl. No.: 10/721,763

Filing Date: 6/7/2004

Examiner: Unassigned

Art Unit: 1645

**CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign applications filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of each original foreign application:

- Japan Patent Application No. 2001-314489 filed 10/11/2001;
- Japan Patent Application No. 2001-243040 filed 8/9/2001; and
- Japan Patent Application No. 2001-150213 filed 5/18/2001.

Respectfully submitted,

By S. A. Bent

Date 30 December 2004

FOLEY & LARDNER LLP  
Customer Number: 22428  
Telephone: (202) 672-5404  
Facsimile: (202) 672-5399

Stephen A. Bent  
Attorney for Applicant  
Registration No. 29,768

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2001年10月11日

出願番号  
Application Number: 特願2001-314489

[ST. 10/C]: [JP 2001-314489]

出願人  
Applicant(s): 麒麟麦酒株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2004年5月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P01-0743  
【提出日】 平成13年10月11日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C07K 16/00  
【発明の名称】 抗T R A I L - R 抗体  
【請求項の数】 44  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内  
【氏名】 森 栄治  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内  
【氏名】 片岡 之郎  
【特許出願人】  
【識別番号】 000253503  
【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平木 祐輔  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100096183  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石井 貞次  
【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2001-150213  
【出願日】 平成13年 5月18日

## 【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2001-243040

【出願日】 平成13年 8月 9日

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809317

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗TRAIL-R抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2に結合する抗体又はその機能的断片。

【請求項 2】 以下の(a)～(c)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する請求項1記載の抗体又はその機能的断片。

(a) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現している癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を有する

(b) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現しているヒト正常細胞には影響を及ぼさない

(c) ヒト肝臓細胞傷害を誘発しない

【請求項 3】 以下の(a)～(c)のすべての性質を有する抗体又はその機能的断片。

(a) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現している癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を有する

(b) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現しているヒト正常細胞には影響を及ぼさない

(c) ヒト肝臓細胞傷害を誘発しない

【請求項 4】 TRAIL-R2には結合するがTRAIL-R1には結合しない請求項2又は3記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 5】 マウス-マウスハイブリドーマにより產生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 6】 ヒト抗体であることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 7】 TRAILとの共存下で癌細胞にアポトーシスを誘導する活性が増強されないことを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項8】 TRAILとの共存下で癌細胞にアポトーシスを誘導する活性が増強されることを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項9】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項10】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項11】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $2-10 \mu\text{g}/\text{ml}$ である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項12】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項13】 細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項14】 細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項15】 細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項16】 細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $0.02-0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項17】 細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその

機能的断片。

【請求項 18】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $2-10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、かつ、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $0.02-0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 19】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の2倍以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 20】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の10倍以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 21】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の50倍以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 22】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の50倍-100倍である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 23】 細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の100倍以上である請求項1～8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 24】 癌細胞がColo205細胞である請求項2、3、7、8及び13～23のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 25】 癌細胞が、Colo205細胞、U251細胞又はJurkat細胞である請求項2、3、7及び8のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 26】 腫瘍の増殖を抑制し、又は腫瘍を退縮させることができる

請求項1～25のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項27】 腫瘍が、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも1つである、請求項26記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項28】 腫瘍が、ヌードマウスに移植されたColo205細胞に由来するものである請求項26記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項29】 腫瘍の増殖を抑制し、又は腫瘍を退縮させることができる期間が少なくとも9日間である請求項26～28のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項30】 抗体又はその機能的断片の投与量が100μg/body又は5mg/kgである請求項26～29のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項31】 抗体又はその機能的断片の投与量が20μg/body又は1mg/kgである請求項26～29のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項32】 抗体又はその機能的断片の投与量が4μg/body又は200μg/kgである請求項26～29のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項33】 抗体又はその機能的断片の投与量が1μg/body又は50μg/kgである請求項26～29のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項34】 イムノグロブリンG型抗体であることを特徴とする、請求項1～33のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項35】 ハイブリドーマE-11-13、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-12、F-4-8又はG-3-10により產生される、TRAIL-R1又はTRAIL-R2に結合する抗体又はその機能的断片。

【請求項36】 受託番号がFERM BP-7599であるハイブリドーマH-48-2、受

託番号がFERM BP-7698であるハイブリドーマE-11-13、受託番号がFERM BP-7699であるハイブリドーマF-4-8又は受託番号がFERM BP-7700であるハイブリドーマL-30-10により產生される、TRAIL-R1又はRAIL-R2に結合する抗体又はその機能的断片。

【請求項37】 E-11-13、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-12、F-4-8及びG-3-10からなる群から選ばれる、TRAIL-R2に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

【請求項38】 受託番号がFERM BP-7599であるハイブリドーマH-48-2、受託番号がFERM BP-7698であるハイブリドーマE-11-13、受託番号がFERM BP-7699であるハイブリドーマF-4-8及び受託番号がFERM BP-7700であるハイブリドーマL-30-10から選ばれる、TRAIL-R2に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

【請求項39】 請求項37又は38記載のハイブリドーマを培養し、得られる培養物からTRAIL-R2に結合する抗体を採取することを特徴とする、抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項40】 請求項37又は38記載のハイブリドーマから抗TRAIL-R2モノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して前記モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清又は宿主の分泌物から抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項41】 宿主が、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれるいずれかのものである請求項40記載の製造方法。

【請求項42】 TRAIL-R2に結合する抗体の集団から、TRAIL-R1には結合しないものを選抜する工程を含むことを特徴とする、肝細胞傷害性を有しない抗TRAIL-R2抗体の製造方法。

【請求項43】 請求項1～36のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する、腫瘍の予防又は治療剤。

【請求項44】 腫瘍が、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも1つである、請求項43記載の予防又は治療剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

###### 【発明の属する技術分野】

本発明はアポトーシスに関する細胞膜分子であるTRAIL受容体1(TRAIL-R1)又はTRAIL受容体2(TRAIL-R2)を認識する抗TRAIL受容体(TRAIL-R)抗体に関する。

さらに本発明は、抗TRAIL-R抗体を有効成分とする、TRAIL-Rを発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療剤に関する。

##### 【0002】

###### 【従来の技術】

生体内において、正常な細胞交代のために生じる生理的な細胞死はアポトーシスと呼ばれ、病理的な細胞死である壊死(ネクローシス)とは区別される[Kerr, et al. (1972) Br. J. Cancer 26, 239参照]。アポトーシスは、胚発生やリンパ球(T細胞及びB細胞)の選択などの過程において一般に見られる現象である[Itaya, S., et al. (1991) Cell 66, 233-243参照]。アポトーシスにより本来排除されるべき細胞が排除されないと、それが癌、ループス、ヘルペスウイルス感染などの原因になることがあると考えられている。また、本来生存すべき細胞がアポトーシスにより排除されてしまうと、AIDS、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、網膜色素変性症、再生不良性貧血、心筋梗塞、脳卒中、毒性物質による肝障害などの疾患や病態の原因となる場合がある[Kataoka, S., et al. (1996) The Oncologist 1, 399-401参照]。

### 【0003】

アポトーシスにおいては細胞表面の湾曲、核クロマチンの凝縮、染色体DNAの断片化、ミトコンドリアの機能消滅等の現象が特徴的に観察される。内因性、外因性の様々なシグナルがこの様な細胞の変化を引き起こしていると考えられており、内因性のものとして、myc、bcl-2などの癌遺伝子や、p53などの癌抑制遺伝子がアポトーシスの誘導に関わっていることが報告されている [片岡之郎ら (1993) 実験医学 11, 17, 2324-2328参照]。外因性シグナルとしては、化学療法剤や放射線などが、アポトーシスを誘導することが知られている [片岡之郎ら (1994) 最新医学 49, 6, 1152-1157参照]。

### 【0004】

このようなアポトーシスに関与する分子としては、腫瘍壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、腫瘍壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ )、Fasリガンドなどの腫瘍壞死因子ファミリー (TNFファミリー) に属する分子が同定されている。TNF- $\alpha$  及びTNF- $\beta$  は癌細胞にアポトーシスを誘導するとの報告がある [Schmid, et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 1881参照; Dealtry et al. (1987) Eur. J. Immunol. 17, 689参照]。マウスのFas又はFasリガンドの変異個体は自己免疫疾患の状態を呈することから、Fasリガンドが末梢における自己抗原反応性のリンパ球をアポトーシスにより排除する機能を担っていることが強く示唆されている [Krammer, et al. (1994) Curr. Op. Immunol. 6, 279-289参照; Nagata, et al. (1995) Science 267, 1449-1456参照]。Fasに特異的に結合するアゴニスティックなマウスモノクローナル抗体は、癌細胞に対してTNF- $\alpha$  と同程度のアポトーシス誘導活性を示すことが報告されている [Yonehara, et al. (1989) J. Exp. Med. 169, 1747-1756]。

これらのTNFファミリー分子は、細胞表面の特異的受容体に結合することで細胞内にシグナルを伝達している。TNFファミリー分子の受容体は複数知られており、TNFレセプターファミリー分子と呼称される。

### 【0005】

TNFレセプターファミリーの分子は、細胞外ドメインのシステインリッチ反復の存在により定義されるが、その中でもFasリガンド及びTNF- $\alpha$  の受容体であるFas及びTNFR1は、ショウジョウバエ自殺遺伝子reaper [Golstein, P., et al. (19

95) Cell 81, 185-186参照；White, K., et al. (1994) Science 264, 677-683参照]と相同性を示す領域である「デスドメイン」と呼ばれるアポトーシスのシグナル伝達に必須の領域を細胞内に持つ。Fasの活性化は、デスドメインを含むアダプター分子FADD/MORT1の会合を促し、FADD/MORT1に結合しているカスパーゼ(Caspase)-8の活性化を引き起こす。活性化したカスパーゼ-8により下流のカスパーゼ分子群を順次活性化し、最終的に細胞をアポトーシスへと導く [Nagata, S., (1997) Cell 88, 355-365参照]。

#### 【0006】

最近、新規のアポトーシスを誘導するTNFファミリー分子が発見された。Wileyら [Immunity (1995) 3, 673-682参照]は、この分子を「TNF関連アポトーシス誘導リガンド」又は簡潔に「TRAIL」と命名した。この分子はまた、「Apo-2リガンド」又は「Apo-2L」とも呼ばれている[Pitt, R. M., et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 12687-12690参照]。便宜上、この分子はTRAILとして本明細書中では呼ぶこととする。

#### 【0007】

Fasリガンドとは異なり、有意なレベルのTRAILは多くのヒトの組織中で検出される（例えば、脾臓、肺、前立腺、胸腺、卵巣、小腸、大腸、末梢血リンパ球、胎盤、腎臓）。そしていくつかの細胞株において恒常的に転写される。TRAILは、Fasによる死のシグナル伝達に類似する時間枠内で、TNF誘導性アポトーシスよりも非常に早くアポトーシスを急速に活性化させることも示されている。[Marsters, S. A., et al. (1996) Curr. Biol. 6, 750-752参照]。

#### 【0008】

TRAILの受容体として、現在すでに五つのタンパク質が同定されている。TRAIL-R1/DR4及びTRAIL-R2/DR5の二つの受容体は、ともにデスドメインを細胞内領域にもつことが報告されている。TRAIL-R1の転写産物は脾臓、末梢血白血球、小腸、胸腺を含むヒトの多くの組織中で認められる。TRAIL-R2の転写産物は脾臓、末梢血リンパ球、卵巣をはじめとした、多くの組織中で確認されている[Pan, G., et al. (1997) Science 276, 111-113参照；Pan, G., et al. (1997) Science 277, 815-818参照；Walczak, H., et al. (1997) EMBO J 16 (17) 5386-5397参照]。

TRAIL-R2には選択的スプライシング (alternative splicing) による2つの形態があり、癌細胞においては440アミノ酸から成るTRAIL-R2の発現量が多いことが報告されている [Screaton, G. R., et al. (1997) Curr Biol 7 (9), 693-696参照; Arai, T., et al. (1998) Cancer Letters 133, 197-204参照]。

#### 【0009】

組換え型ヒトTRAILは、TRAILの細胞外領域からなる組換えタンパク質であり、これまでに多種類の癌細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている [Griffith, T. S., et al. (1998) Curr. Opin. Immunol., 10, 559-563参照]。

さらに、組換え型ヒトTRAILは、ヒトの大腸癌細胞及び乳癌細胞を用いた担癌マウスモデルで効果を示している [Walczak, H., et al. (1999) Nature Medicine 5, 2, 157-163参照]。同じくTNFレセプターファミリーに属し、アポトーシス誘導活性を持つTNF- $\alpha$  やFasリガンドとは異なり、TRAILはマウス及びカニクイザルの正常組織に対して傷害を与えることはなかった [Ashkenazi, A., et al. (1999) J. Clin. Invest. 104, 155-162参照]。

#### 【0010】

これらの報告により、TRAILは腫瘍選択的に細胞死を誘導すると考えられたが、TRAILの受容体は正常細胞にも発現しており選択性の理論的裏付けは未だなされていない。さらに、最近組換えヒトTRAILがヒト正常肝実質細胞にアポトーシスを誘導することが報告され [Jo, M., et al. (2000) Nature Medicine 6, No. 5, 564-567参照]、また、ヒト脳細胞にもアポトーシスを誘導することが報告された [Nitsch, R., et al. (2000) The Lancet 356, 827-828参照]。肝臓細胞にアポトーシスを誘導するアゴニスティックな抗Fas抗体は、非常に短時間で劇症肝炎を誘発しマウスやチンパンジーを死に至らしめる事から、TRAILの肝細胞に対する細胞死誘導は特に大きな問題として注目を浴び、TRAILをヒトに対し医薬品として使用する場合の安全性に疑問が投げかけられた [Nagata, S., (2000) Nature Medicine 6, 5, 502-503参照]。

#### 【0011】

TRAILの肝細胞に対する細胞死誘導活性の有無は、組換えTRAILタンパク質の種類に依存しているとの報告も出されている [Lawrence, D., et al. (2001) Natur

e Medicine 7, 4, 383-385参照]が、組換えTRAILタンパク質の安全性は未だ研究の途上である。

#### 【0012】

最近、マウスに投与した際に肝臓傷害を誘発しない抗Fas抗体が初めて報告された [Ichikawa, K., et al. (2000) International Immunology 12, No.4, 555-562参照]。肝臓傷害を誘発しないことが確認された組換え型Fasリガンドは知られていない。この事は、リガンドでは期待できない活性を持つ抗体を得ることが可能なことを示唆している。しかし、この抗体がT細胞にはアポトーシスを誘導するにもかかわらず、何故肝毒性を示さないのか理論的な背景は明らかになつておらず、例えばTRAILなど抗原が異なる場合に毒性のないアゴニステック抗体を取得できるかどうかは定かではない。

#### 【0013】

TRAILは、前述の様にTRAIL-R1若しくはTRAIL-R2又はこれらの両方に作用してアポトーシスを誘導するが、TRAILが肝細胞にアポトーシスを誘導する時どのレセプターを介してシグナルを入れるのかは明らかになっていない。また、アゴニステイック抗体にTRAIL-R1/R2選択性を付加することで肝毒性が回避できるかどうかという着想に立った研究は今だなされていない。

#### 【0014】

悪性腫瘍に対しては、癌細胞を除去し、正常組織又は細胞を保護することが有効な治療手段となる。組換え型ヒトTRAILによるアポトーシス誘導を作用機序とする薬物では、癌細胞を除去できても正常組織、特に肝臓、脳に傷害を起こす可能性がある。

#### 【0015】

現在、細胞膜上に存在するレセプターであるCD20を標的としたキメラ抗体、Her2/neuを標的としたヒト化抗体などのモノクローナル抗体が、悪性腫瘍を対象疾患として使用されており、その治療効果が認められている。抗体は、血中半減期が長く、抗原への特異性が高いという特徴を持ち、抗腫瘍剤として特に有用である。例えば、腫瘍特異的な抗原を標的とした抗体であれば、投与した抗体は腫瘍に集積する事が推定されるので、補体依存的細胞傷害や抗体依存的細胞傷害に

よる、免疫システムの癌細胞に対する攻撃が期待できる。また、その抗体に放射性核種や細胞毒性物質などの薬剤を結合しておくことにより、結合した薬剤を効率よく腫瘍部位に送達することが可能となり、同時に、非特異的な他組織への該薬剤到達量が減少することで、副作用の軽減も見込むことができる。腫瘍特異的抗原に細胞死を誘導するような活性がある場合はアゴニスティックな活性を持つ抗体を投与することで、また、腫瘍特異的抗原が細胞の増殖及び生存に関与する場合は中和活性を持つ抗体を投与することで、腫瘍特異的な抗体の集積と、抗体の活性による腫瘍の増殖停止又は退縮が期待される。

#### 【0016】

抗体は、上記のようにその特徴から抗腫瘍剤として適用するのに適切であると考えられる。しかもTRAILの受容体に対する抗体であれば、組換え型ヒトTRAIL自身では回避できない肝臓への傷害を回避し、かつ、癌細胞に対しては同等のアポトーシス誘導活性をもつものが得られる可能性がある。しかしながら、現在までにその様な抗体の報告はなされていない。

#### 【0017】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の第1の目的は、これまでに報告されていない、ヒトTRAIL-R1及び/又はヒトTRAIL-R2に結合でき、癌細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導し、かつ、組換えヒトTRAILタンパク質では傷害を引き起こす可能性のあるヒト正常肝実質細胞に対して、傷害を誘発しない新規な抗体、又はそれに類似した分子を提供することにある。第2の目的は、上記抗体、又はそれに類似した分子を有効成分として含有する、現在治療困難な固形腫瘍をはじめとした各種悪性腫瘍の予防又は治療剤を提供することにある。

#### 【0018】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒトTRAIL-R1及びR2に対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、遺伝子工学技術を用いてヒト由来の抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスを製造し、トランスジェニックマウスをヒトTRAIL-R1又はR2で免疫し、モノクローナル抗体の製造において慣用されているケーラー及びミルシ

ユタインらの方法[(1975) Nature 256, 495参照]を用いることにより、新規TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを作出し、その培養上清より該モノクローナル抗体を取得する事に成功した。そして、この新規モノクローナル抗体は、癌細胞の表面にあるTRAIL-R1及び/又はR2に結合して癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することを見出し、本発明を完成するに至った。

### 【0019】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2に結合する抗体又はその機能的断片。

上記抗体又はその機能的断片は、以下の(a)～(c)から選ばれる少なくとも1つの性質を有するものである。

(a) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現している癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を有する

(b) TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現しているヒト正常細胞には影響を及ぼさない

(c) ヒト肝臓細胞傷害を誘発しない

本発明においては、上記の(a)～(c)の全ての性質を有する抗体又はその機能的断片が好ましい。また、上記(a)～(c)の少なくとも1つの性質を有する抗体又はその機能的断片であってTRAIL-R2には結合するがTRAIL-R1には結合しないものも、本発明の抗体又はその機能的断片に含まれる。

### 【0020】

(2) 上記抗体は、マウスマウスハイブリドーマ、例えばE-11-13、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-12、F-4-8又はG-3-10により產生されるモノクローナル抗体であり、ヒト抗体であることが好ましい。E-11-13、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-12、F-4-8により產生されるモノクローナル抗体のタイプはイムノグロブリンG(IgG)型であり、G-3-10により產生されるモノクローナル抗体のタイプはイムノグロブリンM(IgM)型である。これらのモノクローナル抗体の中には、TRAILと共に存することにより、癌細胞にアポトーシスを誘導する活性が増強されるものも、増強されないものも含まれる。ここで

、ハイブリドーマH-48-2は、受託番号がFERM BP-7599として、ハイブリドーマE-11-13は受託番号がFERM BP-7698として、ハイブリドーマF-4-8は受託番号がFERM BP-7699として、ハイブリドーマL-30-10は受託番号がFERM BP-7700として、それぞれ寄託されている。

ここで、癌細胞としては、大腸癌細胞Colo205、神経膠腫由来U251細胞又はT細胞リンパ腫由来Jurkat細胞が挙げられ、これらの細胞の中から適宜選ばれる。

### 【0021】

(3) 本発明の抗体又はその機能的断片は、細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間の条件において、ヒト肝細胞に対するLD50値が $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、好ましくは $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、さらに好ましくは $2-10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、最も好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。一方、本発明の抗体又はその機能的断片は、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間の条件において、癌細胞（例えばColo205細胞）に対するLD50値が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、より好ましくは $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、さらに好ましくは $0.02-0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、最も好ましくは $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である。そして、細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が $2-10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、かつ、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値が $0.02-0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ である組合せの抗体又はその機能的断片が本発明において特に好ましい。

### 【0022】

(4) また、本発明の抗体又はその機能的断片は、細胞数 $7.5 \times 10^4$ 及び反応時間24時間におけるヒト肝細胞に対するLD50値が、細胞数 $2.5 \times 10^3$ 及び反応時間48時間における癌細胞に対するLD50値の2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは50倍以上、さらに好ましくは50倍-100倍、最も好ましくは100倍以上である。

### 【0023】

(5) さらに、本発明の抗体又はその機能的断片は、腫瘍（例えばヌードマウスに移植されたColo205細胞に由来するもの）の増殖を抑制し、又は腫瘍を退縮させることができる。この場合、本発明の抗体又はその機能的断片を投与したときに腫瘍細胞の増殖を抑制することができる期間、又は腫瘍を退縮させることができる期間は少なくとも9日、好ましくは少なくとも11日、さらに好ましくは少なく

とも13日であり、以下少なくとも30日、少なくとも60日の順で好ましく、最も好ましくは少なくとも120日である。また、腫瘍を担持する被検動物（例えば担癌実験動物、体重20gとする）に本発明の抗体又はその機能的断片を投与する量は、 $0.1\mu\text{g}/\text{body}$  ( $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ~  $100\mu\text{g}/\text{body}$  ( $5\text{mg}/\text{kg}$ )、好ましくは $0.1\mu\text{g}/\text{body}$  ~  $100\mu\text{g}/\text{body}$ である。例えば、投与量として $100\mu\text{g}/\text{body}$ 又は $5\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $20\mu\text{g}/\text{body}$ 又は $1\text{mg}/\text{kg}$ 、より好ましくは $4\mu\text{g}/\text{body}$ 又は $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 、さらに好ましくは $1\mu\text{g}/\text{body}$ 又は $50\mu\text{g}/\text{kg}$ である。また、 $0.5\mu\text{g}/\text{body}$  ( $25\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を投与してもよい。投与頻度としては、1週あたり1回~3回の頻度又は隔日投与などが挙げられる。

#### 【0024】

腫瘍としては、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。

#### 【0025】

(6) E-11-13、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-12、F-4-8及びG-3-10からなる群から選ばれる、TRAIL-R2に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

#### 【0026】

(7) 前記ハイブリドーマを培養し、得られる培養物からTRAIL-R2に結合する抗体を採取することを特徴とする、抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の製造方法。

#### 【0027】

(8) 前記ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して前記モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清又は宿主の分

泌物から抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の製造方法。

宿主としては、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれるいずれかのものが挙げられる。

#### 【0028】

(9) TRAIL-R2に結合する抗体の集団から、TRAIL-R1には結合しないものを選抜する工程を含むことを特徴とする、肝細胞傷害性を有しない抗TRAIL-R2抗体の製造方法。

#### 【0029】

(10) 前記抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する、腫瘍の予防又は治療剤。

#### 【0030】

ここで、腫瘍としては、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0031】

##### 【発明の実施の形態】

抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体に、癌細胞に対してアポトーシスを誘導する活性があることは報告がなされている[Griffith, T. S., et al. (1999) J. Immunol. 162, 2597-2605参照；Chuntharapai, A., et al. (2001) J. Immunol. 166, 4891-4898参照]。しかしながら、これらの抗体はマウス由来のものである。

また、組換えヒトTRAILタンパク質において問題となっている、ヒト正常肝実質細胞に対する傷害性について危惧される。

### 【0032】

驚くべきことに、本発明の新規ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体は、ヒト正常組織由来の細胞に対してのみならず、組換えヒトTRAILタンパク質による細胞傷害性が危惧される正常肝実質細胞に対しても、傷害を誘発する副作用が無いことが判明した。本発明者らは、このTRAIL-R2に対して特異的な、新規抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を取得することにより、安全性及び治療効果の向上の可能性という利点を備えた抗体を作製することに世界に先んじて初めて成功し、本発明を完成させた。該モノクローナル抗体は完全ヒト抗体であり、マウス由来の抗体では常に問題となる抗原性については、すでに回避されている。

### 【0033】

該抗体としてはイムノグロブリンG(IgG)、同A(IgA)、同E(IgE)及び同M(IgM)のいずれの型も好適に用いられるが、通常はIgGがより好適である。

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

### 【0034】

#### 1. TRAIL及びその抗体

本発明の抗体は、腫瘍壊死因子(TNF)関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)の受容体(TRAIL-R)に対する抗体であり、①TRAIL-R1に反応する抗体、②TRAIL-R2に反応する抗体、及び③TRAIL-R1とTRAIL-R2の両者に反応する抗体が存在する。本発明では、①の抗体を「抗TRAIL-R1抗体」、②及び③の抗体を「抗TRAIL-R2抗体」ということもある。また、本明細書においてTRAIL-R1とTRAIL-R2の両方のTRAIL受容体を便宜的に合わせて説明する場合は、「TRAIL-R1及びR2」ということもある。従って、例えば「TRAIL-R1及びR2発現ベクター」のように記載した場合は（後述の実施例1参照）、TRAIL-R1の発現ベクターと、TRAIL-R2の発現ベクターの2つを説明することを意味する。

### 【0035】

本発明における「抗体」とは、前記に定義したようなヒトTRAIL-R1及びR2又はその一部に反応性を有する抗体又は抗体の一部であり、これらの抗体の機能的断片も含む。「機能的断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、抗体の抗

原への作用を1つ以上保持するものを意味し、具体的にはF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、及びこれらの重合体等が挙げられる(D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd)。

#### 【0036】

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。

本発明の抗体としては、例えば、後述の実施例7に記載される、ヒトTRAIL-R1及びR2の発現する癌細胞にアポトーシスを誘導する特性を有する各種の抗体、を挙げることができる。

#### 【0037】

本発明の抗体には、抗体を構成する重鎖及び/又は軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び/又は軽鎖からなるモノクローナル抗体も含まれる。本発明の抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（site specific mutagenesis）を用いて定法により導入することができる（Proc Natl Acad Sci USA., 1984 Vol81:5662）。ここで、抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域、並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含む全ての領域が、イムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。

#### 【0038】

本発明の抗TRAIL-R1及びR2抗体は、下記のような製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前記で定義したようなヒトTRAIL-R1及びR2又はその一部と、抗原の抗原性を高めるための適当な物質（例えば、bovine serum albumin等）との結合物を、必要に応じて免疫賦活剤（フロイントの完全又は不完全ア

ジュバント等)とともに、ヒト抗体産生トランスジェニックマウス等を含む非ヒト哺乳動物に免疫する。あるいは、ヒトTRAIL-R1をコードする遺伝子、又はヒトTRAIL-R2をコードする遺伝子を導入し、TRAIL-R1又はTRAIL-R2を細胞表面に過剰に発現している動物細胞を投与することにより、免疫感作を行うことができる。モノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を产生するクローニングを選択することによって取得することができる。

### 【0039】

本発明の抗体は、当業者に周知である遺伝子工学的改変により異なるサブクラスのものに変換されたものも包含する。例えば、本発明の抗体のサブクラスをIgG2又はIgG4に変換することにより、Fcレセプターに対する結合度の低い抗体を取得することができる。逆に、本件発明の抗体のサブクラスをIgG1又はIgG3に変換することにより、Fcレセプターに対する結合度の高い抗体を取得することができる。さらに、本発明の抗体の定常領域のアミノ酸配列を人為的に改変すること、あるいはそのような配列を有する定常領域配列と結合することにより、Fcレセプターに対する結合度を変化させることも可能である。また、本発明の抗体に、ヨード、イットリウム、インジウム、テクネチウム等の放射性核種（J.W.Goding, *Monoclonal Antibodies: principles and practice.*, 1993 AcademicPress）、緑膿菌毒素、ジフテリアトキシン、リシンのような細菌毒素、及びメトトレキセート、マイトマイシン、カリキアマイシンなどの化学療法剤（D.J.King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies.*, 1998 T.J. International Ltd. ; M.L.Grossbard., *Monoclonal Antibody-BasedTherapy of Cancer.*, 1998 Marcel Dekker Inc）、さらに、Maytansinoid等のプロドラッグ（Chari et al., *Cancer Res.*, 1992 Vol.52:127; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996 Vol.93:8681）などを結合させることにより癌などの疾患の治療効果をさらに増強することも可能である。また、発明者らは、本発明の抗体において、TRAIL-R2に結合し、TRAIL-R1には結合しない性質を有するものに、ヒト肝臓細胞に傷害を誘発しないものが含まれることを発見した。従って、本発明は、TRAIL-R2に

結合する抗体の集団から、TRAIL-R1には結合しないものを選抜する工程を含むことを特徴とする、肝細胞傷害性を有しない抗TRAIL-R2抗体の製造方法をも提供する。しかしながら、肝細胞傷害性を有しない本発明の抗体は、TRAIL-R2に結合し、TRAIL-R1には結合しない性質を有するものに限定されるものではない。

#### 【0040】

本発明において、モノクローナル抗体の製造にあたっては、下記の作業工程を包含する。すなわち、(1)免疫原として使用する、生体高分子の精製及び/又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、(2)抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、(3)骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、(4)抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、(5)目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、(6)単一細胞クローンへの分割（クローニング）、(7)場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、(8)このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

以下、抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

#### 【0041】

##### (1) 抗原の精製

抗原としては、ヒトTRAIL-R1及びR2の細胞外領域とヒトIgGのFc領域との融合タンパク質（以下TRAIL-R1-hFc及びTRAIL-R2-hFcという）を用いることができる。TRAIL-R1-hFc及びTRAIL-R2-hFcは、TRAIL-R1又はR2とヒトIgGのFc領域との融合タンパク質をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを動物細胞に導入し、取得した形質転換株の培養上清から精製することにより取得できる。あるいは、ALEXIS社から市販されているTRAIL-R1-hFc及びTRAIL-R2-hFcを用いる事もできる。また、ヒト細胞株の細胞膜上に存在するTRAIL-R1及びR2そのものを精製したものも、抗原として使用することができる。さらに、

TRAIL-R1及びR2の一次構造は公知である [Pan, G., et al. (1997) *Science* 276, 111-113 及び *Science* 277, 815-818 参照; Walczak, H., et al. (1997) *EMBO J* 16 (17) 5386-5397 参照] ので、当業者に周知の方法により、TRAIL-R1及びR2のアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。

#### 【0042】

また、免疫原としては、ヒトTRAIL-R1及びR2の全長から細胞内領域のデスドメイン及びデスドメインよりC末端側のアミノ酸を除いたヒトTRAIL-R1及びR2（以下「TRAIL-R1及びR2delta」という）を有する発現ベクターpEF-TRAIL-R1delta及びpEF-TRAIL-R2deltaをL929細胞に導入し、細胞表面にTRAIL-R1及びR2deltaを過剰に発現している細胞も有効である。pEF-TRAIL-R1delta及びpEF-TRAIL-R2deltaは、それぞれ、ヒトTRAIL-R1deltaタンパク質をコードするDNA及びヒトTRAIL-R2deltaタンパク質をコードするDNAを、動物細胞用発現ベクターpEFneo [Ohashi, H., et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 158-162 参照] に組み込むことにより作製できる。ただし、TRAIL-R1及びR2をコードするDNA、ベクター、宿主等はこれらに限定されない。

#### 【0043】

具体的には、pEF-TRAIL-R1及びR2deltaでL929細胞を形質転換して得られた形質転換株を培養し、pEFneoベクターが挿入された細胞に獲得されるネオマイシン耐性の形質、及びヤギ抗TRAIL-R1及びR2ポリクローナル抗体（DAKO社製）を用いたTRAIL-R1及びR2delta発現の確認とを指標に、ヒトTRAIL-R1及びR2deltaをその細胞表面に過剰に発現しているL929細胞を作製することができる。

#### 【0044】

##### (2) 抗体産生細胞の調製工程

(1)で得られた抗原と、フロイントの完全若しくは不完全アジュvant、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、ヒト由来の抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスが最も好適に用いられるが、そのようなマウスは富塚らの文献 [Tomizuka, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2000 Vol 97:722] に記載されている。

### 【0045】

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。

免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは3日間から1週間間隔で）複数回繰返し行なうことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。

### 【0046】

ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法又はELISA法がより好適である。

### 【0047】

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行なうことができる。まず、精製又は部分精製した組換えヒトTRAIL-R1及びR2をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、一次抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗TRAIL-R1及びR2抗体を結合させる。さらに二次抗体として酵素標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

### 【0048】

#### (3) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが

、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）ミエローマ株P3X63Ag8U.1(P3-U1) [Yelton, D.E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978) ]、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) [Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976) ]、Sp2/0-Ag14(SP-2) [Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978) ]、P3X63Ag8.653(653) [Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979) ]、P3X63Ag8(X63) [Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975) ]などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地〔グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下「FCS」という）を加えたRPMI-1640培地に8-アザグアニンを加えた培地〕、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium；以下「IMDM」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium；以下「DMEM」という）で継代培養するが、細胞融合の3～4日前に正常培地（例えば、10% FCSを含むDMEM培地）で継代培養し、融合当日に $2 \times 10^7$ 以上の細胞数を確保しておく。

#### 【0049】

##### (4)細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、骨髓、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

#### 【0050】

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程(3)で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

#### 【0051】

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えばDMEM）、又はリン酸緩衝生理食塩

液（以下「PBS」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5:1～10:1程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら1mlの50%（w/v）ポリエチレングリコール（分子量1000～4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10mlの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン（以下「HAT」という）液及びヒトインテロイキン-6（以下「IL-6」という）を含む正常培地（以下「HAT培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下「プレート」という）の各ウェルに分注し、5%炭酸ガス存在下、37℃で2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

### 【0052】

#### (5)ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

### 【0053】

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノブテリンを除いた培地（以下「HT培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA法により抗TRAIL-R1及びR2抗体価を測定する。ただし、ELISA用の抗原として上記融合タンパク質を用いる場合は、ヒトIgGのFc領域に特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択しないように、該クローンを除外する操作が必要である。そのようなクローンの有無は、例えばヒトIgGのFc領域を抗原としたELISA等により確認することができる。

以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する

培地組成も変化する。

#### 【0054】

##### (6) クローニング工程

(2)の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を產生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釀して培養する限界希釀法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニュピレーターによって1個づつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釀法が簡便であり、よく用いられる。

#### 【0055】

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釀法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体產生ハイブリドーマ株として選択する。

なお、本発明のヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の產生細胞であるマウスマウスハイブリドーマH-48-2は、平成13年5月18日付で独立行政法人産業技術総合研究所（茨城県つくば市東1丁目1番地1）に国際寄託されている。国際寄託番号は、FERM BP-7599である。また、ハイブリドーマE-11-13は受託番号がFERM BP-7698として、ハイブリドーマF-4-8は受託番号がFERM BP-7699として、ハイブリドーマL-30-10は受託番号がFERM BP-7700として、平成13年8月8日付で国際寄託されている。したがって、例えばマウス-マウスハイブリドーマを用いて抗体を調製する場合は、工程(6)までを省略して、以下に記載する工程(7)から抗体の調製を行うことができる。また、マウスの腹水中等でのインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

#### 【0056】

##### (7) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法

を用いて精製することにより、本発明の予防又は治療剤を有効成分として含有する抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えばBALB/c）若しくはNu/Nuマウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明の予防又は治療剤を有効成分として含有する抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、MAbTrap GIIキット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することができる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒトTRAIL-R1及びR2に対して高い抗原特異性を有する。

### 【0057】

#### (8) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行なうことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ouchterlony）法、ELISA法、又はRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度 [1.4(OD280)=イムノグロブリン1mg/ml] より算出する方法により行なうことができる。

### 【0058】

モノクローナル抗体の認識エピトープの同定は以下のようにして行なうことができる。まず、モノクローナル抗体の認識する分子の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いてその分子の様々な部分ペプチドを作成する方法、遺伝子組換え技術を用いて目的の部分ペプチドをコードするDNA配列を好適な発現プラスミドに組み込み、大腸菌等の

宿主内外で生産する方法等があるが、上記目的のためには両者を組み合わせて用いるのが一般的である。例えば、抗原タンパク質のC末端又はN末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製した後、それらに対するモノクローナル抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定する。

#### 【0059】

その後、さらに細かく、その対応部分のオリゴペプチド、又は該ペプチドの変異体等を、当業者に周知のオリゴペプチド合成技術を用いて種々合成し、本発明の予防又は治療剤が有効成分として含有するモノクローナル抗体のそれらペプチドに対する結合性を調べるか、又は該モノクローナル抗体と抗原との結合に対するペプチドの競合阻害活性を調べることによりエピトープを限定する。多種のオリゴペプチドを得るために簡便な方法として、市販のキット（例えば、SPOTsキット（ジェノシス・バイオテクノロジーズ社製）、マルチピン合成法を用いた一連のマルチピン・ペプチド合成キット（カイロン社製）等）を利用することができる。

#### 【0060】

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる（P. J. Delves., ANTI BODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。

#### 【0061】

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体のL鎖V領域、L鎖C領域、H鎖V領域及びH鎖C領域をそれぞれコードするDNAをPCR法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗TRAI L-R抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴDNAを、鋳型としてはハイブ

リドーマから調製したDNAを使用することができる。これらのDNAを1つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらのDNAをそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドDNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしては $\lambda$ ファージが挙げられる。

#### 【0062】

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

#### 【0063】

本発明において、抗TRAIL-R抗体は、形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破碎物、(c)形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

#### 【0064】

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である(Wright, G., et al. (1991) Bio/Technology 9, 830-834)。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

### 【0065】

#### (9) 抗体の性質

本発明の抗体は下記のa)乃至c)の機能的特性を有し、それぞれの特性は例えば各項目に記載の方法により確認することができる：

- a) ヒト癌細胞を培養し、本発明の抗体を培地に含有せしめた時の該細胞の生存率を調べた結果、TRAIL-R1及び/又はR2を発現している癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を有する。
- b) ヒト正常組織由来細胞を培養し、本発明の抗体を培地に含有せしめた時の該細胞の生存率を調べた結果、TRAIL-R1及び/又はR2を発現している正常細胞には影響を及ぼさない。
- c) ヒト肝実質細胞を培養し、本発明の抗体を培地に含有せしめた時の該細胞の生存率を調べた結果、肝臓細胞傷害を誘発しない。

### 【0066】

本発明の抗体のアポトーシス誘導活性は、LD50値(所定の実験条件において、細胞の半分に死をもたらす抗体の濃度)を指標として表すことができる。LD50値は、後述する実験条件において $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下、好ましくは $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $0.7\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下、さらに好ましくは $0.02\text{--}0.11\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、最も好ましくは $0.02\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下である。

### 【0067】

また、「正常細胞に影響を及ぼさない」又は「肝臓細胞傷害を誘発しない」とは、本発明の抗体の正常細胞（ヒト肝細胞）に対するアポトーシス誘導活性が顕著に高くないことを意味する。LD50値を指標とした場合、後述する実験条件において $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、好ましくは $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、より好ましくは $2\text{--}10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは $10\text{--}24\mu\text{g}/\text{ml}$ 、最も好ましくは $24\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。

### 【0068】

本発明の抗体は、上記a)～c)のいずれかの活性を有するものであるが、好ましくは上記a)記載の活性、すなわち癌細胞に対してアポトーシスを誘導する活性と、上記b)及びc)記載の活性、すなわち正常細胞、特に正常肝実質細胞には傷害を誘発しない活性とを併せ持つ、新規な特性を有する物質である。従って、本発明の抗体は悪性腫瘍に対する予防又は治療剤に含有させるための成分として有用である。

また、TRAIL-R2に結合する抗体であって癌細胞にアポトーシスを誘導する抗体集団の中には、TRAILと共に存させても癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を増強しない性質の抗体が存在する。

### 【0069】

一方、TRAIL-R2に結合する抗体の集団の中には、TRAILとの共存下で癌細胞にアポトーシスを誘導する活性（アポトーシスを増強する活性を含む）を有する抗体が存在する。

正常細胞又は癌細胞に対するアポトーシス誘導活性はLD50値を指標として表すことができる。本発明におけるLD50値は以下のように算出できる。正常細胞（例えばヒト肝細胞）又は癌細胞（例えばヒト大腸癌細胞株Colo205; ATCC CCL-222）を培養し、本発明の抗体を培地に添加し、一定時間経過後の該細胞の生存率をMTTアッセイ（Green, L.M. et al., J. Immunological Methods, 70:257-268(1984)）又はLDHアッセイなどにより測定する。

生存率と添加された抗体の濃度をプロットしたグラフから、生存率50%に相当する抗体濃度をLD50値とする。

LD50値はグラフから読み取ることも、回帰計算によりグラフ曲線の式を求める

ことにより算出することもできる。

#### 【0070】

癌細胞Colo205に対する試験では、96穴平底プレートの1穴あたり $100\mu\text{l}$ の培地に $2.5\times10^3$ の細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養し、抗体を翌日添加し、前記環境下に48時間置いた後に細胞の生存率を測定した。本発明の請求項においては、前記条件を「細胞数 $2.5\times10^3$ 及び反応時間48時間」と記載する。

正常細胞（肝細胞）に対する試験では、96穴平底プレートの1穴あたり $100\mu\text{l}$ の培地に $7.5\times10^4$ の細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養し、抗体を翌日添加し、前記環境下に24時間置いた後に細胞の生存率を測定した。本発明の請求項においては、前記条件を「細胞数 $7.5\times10^4$ 及び反応時間24時間」と記載する。

#### 【0071】

本発明の抗体には、上記の条件でLD50を測定したときに、正常細胞（ヒト肝細胞）に対してLD50値が例えば $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $10\text{ng}/\text{ml}$ )以上、好ましくは $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の性質を有するものが含まれる。正常細胞に対するLD50は高いほど安全性が高いといえるため、 $2-10\mu\text{g}/\text{ml}$ のLD50値を有する抗体がさらに好ましい。また、本発明の抗体には、上記の条件でLD50を測定したときに、癌細胞に対してLD50値が例えば $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは $0.7\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の性質を有するものが含まれる。癌細胞に対するLD50は低いほど殺腫瘍細胞活性が強いといえるため、 $0.02-0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のLD50を有するものがさらに好ましい。特に、本発明のE-11-13抗体及びL-30-10抗体は、そのヒト肝細胞に対するLD50値が $2-10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上（例えば $2-24\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、かつ、癌細胞に対するLD50値が $0.02-0.11\mu\text{g}/\text{ml}$ の性質を有しており、正常細胞に対する安全性と腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導効果を併せ持っている。さらに驚くべきことに、本件発明の抗体は、マウス担癌モデルにおける腫瘍細胞の増殖を顕著に抑制した。

#### 【0072】

ここで、「細胞数 $7.5\times10^4$ 及び反応時間24時間」の条件で測定したときの正常細胞に対するLD50値と、「細胞数 $2.5\times10^3$ 及び反応時間48時間」の条件で測定したときの癌細胞に対するLD50値との比について検討してみる。前記の通り、正常細胞に対するLD50は高いほど安全性が高く、癌細胞に対するLD50は低いほど殺腫

癌細胞活性が強いため、正常細胞に対するLD50値は、癌細胞に対するLD50と比較して、その比は大きいほど有用であるといえる（安全性が高く、癌細胞に対するアポトーシス誘導活性が強い）。癌細胞に対する正常細胞のLD50の比（正常細胞に対するLD50が癌細胞に対するLD50の何倍あるか）をN/C比とすると、本発明の抗体は、N/C=2以上、すなわち正常細胞に対するLD50が癌細胞に対するLD50の2倍以上の性質を有するものである。好ましくは、正常細胞に対するLD50が癌細胞に対するLD50の10倍以上（N/C=10以上）、より好ましくはN/C=10-25であり、以下、順に好ましい範囲がN/C=50、N/C=50以上、N/C=50から100となり、さらに好ましくはN/C=100から240であり、そして最も好ましくはN/C=240以上である。

### 【0073】

#### 医薬組成物

本発明のヒト抗TRAIL-R1及びR2抗体の精製された製剤を含有する製剤もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような製剤は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤又はキャリアを含んでおり、他の抗体又は抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。かかる予防又は治療剤は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

### 【0074】

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.01mg乃至1000mgであり、これらを1回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約0.01mg乃至1000mgを皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。

本発明の抗体又は医薬組成物は、TRAIL-R1及びR2を発現している細胞に起因する

可能性を有する種々の疾患又は症状の治療又は予防への適用が可能である。その疾患又は症状としては、各種悪性腫瘍が挙げられる。

### 【0075】

腫瘍の種類は、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺腫又はウィルムス腫瘍であり、本発明の抗体を適用する際の腫瘍は1種類に限られず、複数種類の腫瘍が併発したものでもよい。

### 【0076】

#### 製剤例

本発明の分子は、水又はそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液又は懸濁液のアンプルとして使用に供される。また、無菌粉末製剤（本発明の分子を凍結乾燥するのが好ましい）をアンプルに充填しておき、使用時に薬理学的に許容し得る溶液で希釈してもよい。

### 【0077】

#### 【実施例】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される態様のみに限定されるものではない。

### 【0078】

#### 実施例1 抗原の調製

ヒトTRAIL-R1及びR2が細胞膜上に過剰発現している細胞を得るため、ヒトTRAIL-R1及びR2の全長アミノ酸から細胞内領域のデスドメイン及びデスドメインよりC末端側のアミノ酸を除いたヒトTRAIL-R1及びヒトTRAIL-R2（以下「TRAIL-R1及びR2delta」という）発現プラスミドベクターを作製した。TRAIL-R1及びR2deltaをコードするDNAは、PCR法により作製した。

## 【0079】

## a)全長ヒトTRAIL-R1及びR2発現ベクターの調製

鋳型PCRを行うにあたり、鋳型として用いたのは、ヒトTRAIL-R1及びR2をコードするcDNAを保持するプラスミドベクターpcDNA3-TRAIL-R1及びpcDNA3-TRAIL-R2である。pcDNA3-TRAIL-R1及びpcDNA3-TRAIL-R2は以下の方法で作製された。完全長ヒトTRAIL-R1 DNA及びTRAIL-R2 DNAを、その5'末端にEcoRI配列を、その3'末端にNotI配列と終止コドンを付加する為のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い修飾した。ヒト胎盤由来cDNA (Clontech社製)を鋳型として、TRAIL-R1についてはプライマーとして：5'-CACGAATTCAACCATGGCGCCACCACCAGCT-3' (配列番号1) 及び5'-TTTCTCGAGGCGGCCGCTTATCACTCCAAGGACACGGCAGAGCCTGTG-3' (配列番号2) を、TRAIL-R2についてはプライマーとして：5'-CACGAATTGCCACCATGGAACAAACGGGGACAG-3' (配列番号3) 及び5'-TTTCTCGAGGCGGCCGCTCATTAGGACATGGCAGAGTCTGCATTACCT-3' (配列番号4) を合成し、プラチナPfxDNAポリメラーゼ (ギブコ・ビーアールエル社製)を使用して、(94°C、20秒；60°C、30秒；68°C、90秒間) ×30サイクルのPCR反応を行った。修飾されたTRAIL-R1及びTRAIL-R2配列を、EcoRI-NotI断片として単離し、同一酵素で解裂されていたpcDNA3 (Invitrogen社製)ベクターに連結した。得られたプラスミドをpcDNA3-TRAIL-R1及びpcDNA3-TRAIL-R2と命名した。pcDNA3-TRAIL-R2に組み込まれたTRAIL-R2は、選択的スプライシングにより形成された2つの断片の中で、1320bpのcDNAにコードされる440アミノ酸から成るものである。以下、実施例中のすべてのPCRの反応温度調節は、ジーンアンプPCRシステム9700；(株)パーキンエルマー・ジャパン社製を使用した。

## 【0080】

## b)ヒトTRAIL-R1及びR2delta発現ベクターの調製

ヒトTRAIL-R1及びR2delta発現ベクターを以下の方法にて調製した。1-351のアミノ酸配列を持つTRAIL-R1部分ペプチド、及び、1-348のアミノ酸配列を持つTRAIL-R2部分ペプチドからなる発現プラスミドを作製するために、TRAIL-R1及びR2部分ペプチドの5'末端にEcoRI配列、3'末端にNotI配列と終止コドンを付加する為のPCR反応を行った。PCRは、TRAIL-R1についてはオリゴヌクレオチドプライマー5'-CACGAATTCAACCATGGCGCCACCACCAGCT-3' (配列番号1) 及び5'-TTCTACGAGCG

GCTTATCACAGCCTCCTCTGAGA-3' (配列番号5) を、TRAIL-R2についてはオリゴヌクレオチドプライマー5'-CACGAATTGCCACCATGGAACAAACGGGGACAG-3' (配列番号3) 及び5'-TTCTACGAGCGGCCGCTTATCACAAAGTCTGCAAAGTCATC-3' (配列番号6) を、プラチナPfxDNAポリメラーゼ (ギブコ・ビーアールエル社製) 、及びpcDNA3-TRAIL-R1, pcDNA3-TRAIL-R2を使用して、(94°C、20秒；65°C、30秒；及び68°C、75秒間) × 25サイクルの条件で行った。修飾されたTRAIL-R1及びR2の部分ペプチドを、EcoRI-NotI断片として単離した。そしてこのEcoRI-NotI断片をEcoRIとNotI酵素で解裂したpEFneoベクターに連結した。得られたプラスミドをpEF-TRAIL-R1delta及びpEF-TRAIL-R2deltaと命名した。

### 【0081】

c) ヒトTRAIL-R1及びR2delta発現細胞の作製

b) で作製したpEF-TRAIL-R1delta及びpEF-TRAIL-R2deltaを、LipofectAMINE Plus (ギブコ・ビーアールエル社製) を用いて、L929細胞 (American Type Culture Collection No. CCL-1) に導入した。遺伝子導入はマニュアルの方法にて行った。細胞培養用フラスコ (培養面積75cm<sup>2</sup>) 中で37°C、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、G418 (ギブコ・ビーアールエル社製) を1mg/mlになるように加え、1週間培養した。次いで、ヤギ抗ヒトTRAIL-R1ポリクローナル抗体及びヤギ抗ヒトTRAIL-R2ポリクローナル抗体 (DAKO社製) を用いたFACS解析を行い、遺伝子導入された細胞でG418耐性の形質を獲得したものは、351アミノ酸からなるTRAIL-R1delta及び348アミノ酸からなるTRAIL-R2deltaを細胞膜表面上に発現していることを確認した。

### 【0082】

PCR用プライマー等のオリゴヌクレオチドの合成は、全てDNA自動合成機 (モデル3948；(株)パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製) を用いて、そのマニュアルに従って行った [Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 参照]。各オリゴヌクレオチドは合成終了後、支持体から開裂させ脱保護を行い、得られた溶液を乾固した後蒸留水に溶解し、使用するまで-20°Cで凍結保存した。

### 【0083】

## 実施例2 ヒト抗体産生マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性Ig重鎖及び $\kappa$ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつ、ヒトIg重鎖遺伝子座を含む14番染色体断片(SC20)及びヒトIg $\kappa$ 鎖トランスジーン(KCo5)を同時に保持する。このマウスはヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統Aのマウスと、ヒトIg $\kappa$ 鎖トランスジーンを持つ系統Bのマウスとの交配により作製した。系統Aは、内因性Ig重鎖及び $\kappa$ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片(SC20)を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告(Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722)に記載されている。また、系統Bは内因性Ig重鎖及び $\kappa$ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒトIg $\kappa$ 鎖トランスジーン(KCo5)を保持するマウス系統(トランスジェニックマウス)であり、例えばFishwildらの報告(Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845)に記載されている。

### 【0084】

系統Aの雄マウスと系統Bの雌マウス、あるいは系統Aの雌マウスと系統Bの雄マウスの交配により得られる子マウスを富塚らの報告(Tomizuka et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722)に記載された方法で解析し、血清中にヒトIg重鎖及び $\kappa$ 軽鎖が同時に検出される個体(ヒト抗体産生マウス)を選抜し(Ishida&Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000)、以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウスは、契約を結ぶことによって、麒麟麦酒株式会社より入手可能である。

### 【0085】

## 実施例3 ヒトTRAIL-R1及びR2に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門(安東民衛ら著作、講談社発行 1991)等に記載されるような一般的方法に従って調製した。免疫原としてのヒトTRAIL-R1及びR2は、実施例1で調製したTRAIL-R1及びR2delta発現L929細胞を用いた。被免疫動物は、実施例2で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

### 【0086】

ヒトTRAIL-R1に対するヒトモノクローナル抗体の調製を目的として、ヒト抗体

產生マウスに、実施例1で作製したTRAIL-R1delta発現L929細胞 ( $3 \times 10^6$ 細胞/匹) を右足蹠に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞を左右足蹠交互に、3日間毎に10回免疫した。さらに以下に述べる脾臓及びリンパ節の取得3日前に同細胞を両足蹠に免疫した。ヒトTRAIL-R2に対するヒトモノクローナル抗体の調製を目的として、ヒト抗体產生マウスに、実施例1で作製したTRAIL-R2delta発現L929細胞 ( $1 \times 10^7$ 細胞/匹) を腹腔内に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞を腹腔内に、1週間毎に5回免疫した。さらに以下に述べる脾臓の取得3日前に同細胞を尾静脈に免疫した。

### 【0087】

免疫されたマウスから脾臓及び/又はリンパ節を外科的に取得し、350mg/ml 炭酸水素ナトリウム、50単位/ml ペニシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシンを含む無血清DMEM培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) (以下「無血清DMEM培地」という) 10ml中に入れ、メッシュ (セルストレイナー：ファルコン社製) 上でスペーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈殿させた後、この細胞を無血清DMEM培地で2回洗浄してから、無血清DMEM培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、10% FCS (シグマ社製) を含むDMEM培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) (以下「血清入りDMEM培地」という) にて、37°C、5%炭酸ガス存在下で細胞濃度が $1 \times 10^8$ 細胞/mlを越えないように培養したミエローマ細胞 SP2/0 (ATCC No.CRL-1581) を同様に無血清DMEM培地で洗浄し、無血清DMEM培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを細胞数5:1で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として50% (w/v) ポリエチレングリコール1500 (ベーリンガーマンハイム社製) 1mlを、ピペットの先でペレットを攪拌しながらゆっくり添加した後、予め37°Cに加温しておいた無血清DMEM培地1mlを2回に分けてゆっくり添加し、さらに7mlの無血清DMEM培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とヒポキサンチン(H)、アミノブテリン(A)、チミジン(T) (以下「HAT」という。:シグマ社製) を含有するDMEM培地中で培養することにより行った。さらに、HT (シグマ社製)

) 含有DMEM培地を用いて限界希釀法によりシングルクローンにした。培養は、96穴マイクロタイタープレート（ベクトンディッキンソン社製）中で行った。抗ヒトTRAIL-R1及びR2ヒトモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマクローンの選択（スクリーニング）及び各々のハイブリドーマが產生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、後述する酵素標識免疫吸着アッセイ(ELISA)及び蛍光活性化セルソーター(FACS)により測定することにより行った。

### 【0088】

ヒトモノクローナル抗体產生ハイブリドーマのELISAによるスクリーニングは、実施例4及び実施例5に述べるELISA、並びに実施例6で記載するFACS解析により、ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖(hIg $\gamma$ )及びヒト免疫グロブリン軽鎖 $\kappa$ を有し、かつヒトTRAIL-R1及び/又はR2に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を產生する多数のハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表又は図中においては、各々の本発明のヒト抗ヒトTRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名した。以下のハイブリドーマクローンはシングルクローンを表す：1-13、1-18、1-32、1-40、1-43、2-6、2-11、2-12、2-18、2-47、2-52、3-1、3-7、3-10、3-23、3-33、3-42、3-53、1-13-6、1-32-9、1-40-4、1-43-43、2-6-48、2-11-5、2-12-10、2-47-11、2-52-12、3-10-19、3-23-8、3-33-7、3-42-3、3-53-15、2-18-2、3-1-7、E-11、E-14、L-30、N-18、X-14、E-11-13、E-14-4、F-4-2、F-4-8、H-48-2、L-30-10、N-18-12、W-40-5、X-14-4、X-51-4、X-51-12、A-11、G-3、H-34、I-22、I-35、J-21、J-26、K-8、K-16、K-57、L-4、P-28、P-36、W-42、X-13、X-60、Z-23、1-39、A-4-27、A-4-29、G-3-10、H-34-2、K-57-12及びW-42-2。それらのうちH-48-2は、平成13年(2001年)5月18日付けで独立行政法人産業技術総合研究所（茨城県つくば市東1丁目1番地1）に国際寄託した。国際寄託番号は、FERM BP-7599である。また、E-11-13、F-4-8及びL-30-10は、平成13年8月8日付けで上記研究所に国際寄託した。国際寄託番号は、E-11-13がFERM BP-7698であり、F-4-8がFERM BP-7699であり、L-30-10がFERM BP-7700である。また、E-11-13、F-4-8およびL-30-10は、平成13年10月1日付けで上記研究所に国際寄託した。国際寄託番号は、E-11-13が、FERM BP-77

70であり、F-4-8がFERM BP-7768であり、L-30-10がFERM BP-7769である。

#### 【0089】

実施例4 ヒト免疫グロブリン軽鎖 $\kappa$  (Ig $\kappa$ )を有する、ヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体又はヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の検出

ヒトTRAIL-R1及びR2の細胞外領域とヒトIgG1のFc領域とが融合したタンパク質（以下、それぞれ「TRAIL-R1-hFc」、「TRAIL-R2-hFc」という）を0.5 $\mu$ g/mlリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という。）に調製したものを50 $\mu$ lずつ、ELISA用96穴マイクロプレート（Maxisorp、ヌンク社製）の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、TRAIL-R1-hFc又はTRAIL-R2-hFcをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬（SuperBlock（登録商標） Blocking Buffer、PIERCE社製）を加え、室温で30分間インキュベートし、TRAIL-R1-hFc又はTRAIL-R2-hFcが結合していない部位をブロックした。このようにして、各ウェルをTRAIL-R1-hFc又はTRAIL-R2-hFcでコーティングしたマイクロプレートを作製した。

#### 【0090】

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清(50 $\mu$ l)を加え、室温下で1時間反応させた後、各ウェルを0.1% Tween20含有PBS(PBS-T)で2回洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ヒトIg $\kappa$ 抗体（50 $\mu$ l/ウェル、Biosource International社製）を10%ブロックエース（大日本製薬株式会社製）含有PBS-Tで2000倍に希釈した溶液を、各ウェルに50 $\mu$ l加え、室温下30分インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-Tで3回洗浄後、TMB発色基質液（DAKO社製）を各ウェルに100 $\mu$ lずつ加え、室温下で20分間インキュベートした。各ウェルに0.5M硫酸（100 $\mu$ l/ウェル）を加え、反応を止めた。波長450nm（参照波長570nm）での吸光度をマイクロプレートリーダー（MTP-300、コロナ電気社製）で測定した。

#### 【0091】

その結果、得られた抗ヒトTRAIL-R1及びR2抗体のうち一部の抗体の性質を表1及び表2に示す。表1は、取得したヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体のサブクラス及び交差反応性を示す表である。表2は、取得したヒト抗TRAIL-R2モノクロ

ーナル抗体のサブクラス及び交差反応性を示す表である。

【0092】

【表1】

ヒト抗TRAIL-R1抗体	サブクラス	交差反応性	
		TRAIL-R1	TRAIL-R2
1-13	IgG4	+	-
1-18	IgG4	+	-
1-32	IgG1	+	-
1-40	IgG1	+	-
1-43	IgG1	+	-
2-6	IgG1	+	-
2-11	IgG1	+	-
2-12	IgG1	+	-
2-18	IgM	+	-
2-47	IgG4	+	-
2-52	IgG1	+	-
3-1	IgM	+	-
3-7	IgM	+	-
3-10	IgG4	+	-
3-23	IgG4	+	-
3-33	IgG4	+	-
3-42	IgG2	+	-
3-53	IgG1	+	-

+ : 反応性あり  
- : 反応性なし

【0093】

【表2】

ヒト抗TRAIL-R2抗体	サブクラス	交差反応性	
		TRAIL-R1	TRAIL-R2
A-4-27	IgM	-	+
A-4-29	IgM	+	+
A-11	IgM	-	+
E-11	IgG1	-	+
E-14	IgG1	-	+
F-4-2	IgG4	-	+
F-4-8	IgG1	-	+
G-3	IgM	-	+
H-34	IgM	-	+
H-48-2	IgG1	-	+
I-22	IgM	-	+
I-35	IgM	-	+
J-21	IgM	-	+
J-26	IgM	-	+
K-8	IgM	-	+
K-16	IgM	-	+
K-57	IgM	-	+
L-4	IgM	-	+
L-30	IgG1	-	+
N-18	IgG4	-	+
P-28	IgM	-	+
P-36	IgM	-	+
W-40-5	IgG1	-	+
W-42	IgM	-	+
X-13	IgM	-	+
X-14	IgG4	-	+
X-51-4	IgG1	-	+
X-51-12	IgG4	-	+
X-60	IgM	-	+
Z-23	IgM	-	+
1-39	IgM	-	+

+ : 反応性あり  
- : 反応性なし

## 【0094】

## 実施例5 各モノクローナル抗体のサブクラス同定

実施例4と同様の方法により、各ウェルをTRAIL-R1-hFc又はTRAIL-R2-hFcでコーティングしたマイクロプレートを作製した後に、各ウェルをPBS-Tで2回洗浄した。TRAIL-R1-hFc又はTRAIL-R2-hFcをコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、実施例4で取得した各々のハイブリドーマの培養上清(50  $\mu$ l)を加え、1時間反応させた後、各ウェルをPBS-Tで2回洗浄した。次いで、各ウェルにそれぞれ西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヒツジ抗ヒトIgG1抗体、ヒツジ抗ヒトIgG2抗体、ヒツジ抗ヒトIgG3抗体又はヒツジ抗ヒトIgG4抗体（各2000倍希釈、50  $\mu$ l/ウェル、The Binding Site社製）を加え、室温下で1時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄後、基質緩衝液（TMB、100  $\mu$ l/ウェル、DAKO社製）を各ウ

エルに加え、室温下で20分間インキュベートした。次いで、0.5M硫酸（100  $\mu$ l/ウェル）を加え、反応を止めた。波長450nm（参照波長570nm）での吸光度をマイクロプレートリーダー（MTP-300, コロナ電気社製）で測定した。その結果を前記表1及び表2に示す。

### 【0095】

#### 実施例6 TRAIL-R1及びR2発現細胞に対する各モノクローナル抗体の反応試験

実施例1で調製したTRAIL-R1delta発現L929細胞及びTRAIL-R2delta発現L929細胞に対する、実施例4で取得した各モノクローナル抗体の反応性の検討を、FACS解析で行った。 $2 \times 10^6$ /mlの濃度で、L929細胞、TRAIL-R1delta発現L929細胞、TRAIL-R2delta発現L929細胞を、1%ウサギ血清入り、0.1%NaN<sub>3</sub>、1%FCS含有PBSのStaining Buffer(SB)に浮遊させた。細胞浮遊液（100  $\mu$ l/ウェル）を96穴丸底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。遠心分離（2000rpm、4°C、2分）した後、上清を除去し、実施例3で培養したハイブリドーマの培養上清（50  $\mu$ l）を加えて攪拌した後、氷温下30分間静置してから、遠心分離（2000rpm、4°C、2分）して上清を除去した。ペレットを100  $\mu$ l/ウェルのSBで2回洗浄した後、0.0125mg/mlのRPE蛍光標識ウサギ抗ヒトIg $\kappa$  F(ab')<sub>2</sub>抗体（DAKO社製）30  $\mu$ lを加え、氷温下30分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300  $\mu$ lのSBに懸濁し、FACS（FACScan、ベクトンディッキンソン社製）で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、いずれの抗体もTRAIL-R1delta発現L929細胞又はTRAIL-R2delta発現L929細胞にのみ強い結合活性を有し、L929細胞への結合活性は認められなかつたことから、TRAIL-R1及びTRAIL-R2と特異的に結合する抗体であることがわかつた。

### 【0096】

#### 実施例7 癌細胞に対する細胞死誘導活性

実施例4乃至6から得られたヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体又はヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの培養上清を用いて、大腸癌細胞であるColo205（ATCC No. CCL-222）に対する細胞死誘導活性を測定した。10%FCSを含むRPMI培地で培養していたColo205細胞を $2.5 \times 10^4$ /mlの濃度に調製し、各ウェル100  $\mu$ lずつを96穴平底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分

注した。37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、ハイブリドーマ培養上清を50μl/ウェルで加え、さらに、ヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体又はヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体がIgGの場合、終濃度5μg/mlになるようにヤギ抗ヒトIgG(γ)特異的ポリクローナル抗体（シグマ社製）を各ウェルに10μlずつ加えた。取得したハイブリドーマの一部について、ヤギ抗ヒトIgG(γ)特異的ポリクローナル抗体を添加しないウェルも作製した。陽性コントロールとして、ヒト組換えTRAILタンパク質（DAKO社製）を終濃度100ng/mlで使用した。陰性コントロールとして、ヒトIgG（Biogenesis社製）を使用した。37℃、5.0%炭酸ガス下で48時間培養した後、MTS試薬（Cell Titer 96 AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assay：プロメガ社製）を説明書の方法に従い調製し、各ウェルに20μlずつ添加した。さらに37℃、5.0%炭酸ガス下で2時間培養した後、波長490nm（参照波長630nm）での吸光度をマイクロプレートリーダー（1420 ARVO マルチラベルカウンター：WALLAC社製）で測定し、ミトコンドリアの還元能を指標として、細胞の生存率を算定した。各ウェルの細胞の生存率を、下記式により算出した：生存率（%）=100×(a-b)/(c-b)（式中、aは被検ウェルの測定値を、bは無細胞ウェルの測定値を、cは陰性コントロールのウェルの測定値をそれぞれ表わす）。結果を図1～3並びに表3及び4に示す。表3は、ヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中の、Colo205及びヒト正常肝実質細胞に対する細胞死誘導活性を示す表であり、表4は、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中の、Colo205及びヒト正常肝実質細胞に対する細胞死誘導活性を示す表である。

【0097】

【表3】

ヒト抗TRAIL-R1抗体	サブクラス	ヒト正常肝細胞生存率	Colo205細胞生存率
1-13-6	IgG4	-	-
1-32-9	IgG1	-	-
1-40-4	IgG1	-	-
1-43-43	IgG1	-	-
2-6-48	IgG1	-	-
2-11-5	IgG1	++	++
2-12-10	IgG1	-	-
2-47-11	IgG4	+	+
2-52-12	IgG1	++	++
3-10-19	IgG4	-	-
3-23-8	IgG4	-	-
3-33-7	IgG4	-	-
3-42-3	IgG2	-	-
3-53-15	IgG1	-	-
2-18-2	IgM	++	++
3-1-7	IgM	-	+
sTRAIL 1μg/ml	-	-	-

++ : 生存率 80%以上

+ : 生存率 21~79%

- : 生存率 20%以下

【0098】

【表4】

ヒト抗TRAIL-R2抗体	サブクラス	ヒト正常肝細胞生存率	Colo205細胞生存率
E-11-13	IgG1	++	-
E-14-4	IgG1	+	+
F-4-2	IgG4	+	-
F-4-8	IgG1	-	-
H-48-2	IgG1	++	-
L-30-10	IgG1	++	-
N-18-12	IgG4	++	-
W-40-5	IgG1	++	+
X-14-4	IgG4	++	+
X-51-4	IgG1	-	-
X-51-12	IgG4	++	-
A-4-29	IgM	-	-
G-3-10	IgM	++	-
H-34-2	IgM	-	-
K-57-12	IgM	+	-
W-42-2	IgM	-	-
sTRAIL 1μg/ml	-	-	-

++ : 生存率 80%以上

+ : 生存率 21~79%

- : 生存率 20%以下

【0099】

その結果、ヒト抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体は、陰性コントロールと比較して明らかにCoLo205細胞に細胞死を誘導する活性があることが明らかとなった。さらに、IgGである一部のヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体では、ヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体非存在下（ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体のクロスリンクが無い状態）においても細胞死を誘導する活性があることが示された。

### 【0100】

#### 実施例8 正常細胞に対する細胞死誘導活性

実施例4乃至6から得られた、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの培養上清を用いて、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞であるHUVEC (Bio whittaker社製) に対する細胞死誘導活性を測定した。EGM-2培地 (Biowhittaker社製) で培養していたHUVEC細胞を $5 \times 10^4$ /mlの濃度に調製し、各ウェル $100 \mu l$ ずつを96穴平底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。37°C、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、ハイブリドーマ培養上清を $50 \mu l$ /ウェルで加え、さらに、ヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体又はヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体がIgGの場合、終濃度 $5 \mu g/ml$ になるようにヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体（シグマ社製）を各ウェルに $10 \mu l$ ずつ加えた。陰性コントロールとして、ヒトIgG (Biogenesis社製) を使用した。37°C、5.0%炭酸ガス下で48時間培養した後、MTS試薬 (Cell Titer 96 AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assay：プロメガ社製) を説明書の方法に従い調製し、各ウェルに $20 \mu l$ ずつ添加した。さらに37°C、5.0%炭酸ガス下で2時間培養した後、波長490nm(参照波長630nm)での吸光度をマイクロプレートリーダー(1420 ARVO マルチラベルカウンター：WALLAC社製)で測定し、ミトコンドリアの還元能を指標として、細胞の生存率を算定した。各ウェルの細胞の生存率は実施例7と同様な式により算出した。

結果を図4に示す。ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体と陰性コントロールとの結果はほぼ同一となり、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体がHUVEC細胞に対して傷害性を示さないことが明らかとなった。

### 【0101】

### 実施例9 ヒト正常肝実質細胞に対する細胞死誘導活性

実施例4乃至6から得られたヒト抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの培養上清を用いて、正常ヒト肝実質細胞Human Hepatocyte（以下「HH細胞」という）（Tissue Transformation Technologies社製）に対する細胞死誘導活性を測定した。まず凍結HH細胞を37℃で融解し、CM5300培地（CEDR A社製）を用いて $7.5 \times 10^5$ /mlの濃度に調製した後に、各ウェル $100 \mu\text{l}$ ずつをコラーゲンタイプIがコートされている96穴平底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。37℃、5.0%炭酸ガス下で4.5時間培養した後、培地の交換を行った。さらに37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養し、再度培地の交換を行った。その後、ハイブリドーマ培養上清を $50 \mu\text{l}$ /ウェルで加え、さらに、終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ になるようにヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体（シグマ社製）を各ウェルに $10 \mu\text{l}$ ずつ加えた。陰性コントロールとして、ヒトIgG（Biogenes is社製）を使用した。37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、顕微鏡下でHH細胞の形態的変化を観察した。その結果、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体と陰性コントロールとの結果はほぼ変わることから、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体がHH細胞に対しても傷害性を示さないことが明らかとなった。

### 【0102】

### 実施例10 各抗体の調製

実施例4乃至6から得られたハイブリドーマの培養上清からのヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を含む培養上清をrmp Protein A（アマシャムファルマシアバイオテク社製）及び $0.8 \times 40\text{cm}$ カラム（バイオラッド社製）を用い、吸着緩衝液としてPBS、溶出緩衝液として0.02M グリシン緩衝液（pH 3）を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1M Tris（pH 9.0）を添加してpH7.2付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（10000カット、Spectrum Laboratories社製）を用いてPBSに置換し、孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターMILLEX-GV（ミリポア社製）でろ過滅菌し、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、 $1\text{mg/ml}$ を $1.4 \text{ OD}$ として算出した。

### 【0103】

ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。まず、ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを10ng/ml Recombinant Human IL-6(R&D Systems社製)、10% Low IgG Fetal Bovine Serum (HyClone社製) 含有eRDF培地 (極東製薬社製) に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保存した。次に、その一部を抗体精製を目的として、ウシインシュリン (5 $\mu$ g/ml、ギブコビーアールエル社製)、ヒトトランスフェリン (5 $\mu$ g/ml、ギブコビーアールエル社製)、エタノールアミン (0.01mM、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム (2.5x10-5mM、シグマ社製)、10ng/ml Recombinant Human IL-6(R&D Systems社製)、1% Low IgG Fetal Bovine Serum (HyClone社製) 含有eRDF培地 (極東製薬社製) に馴化した。フラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が90%になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10 $\mu$ mと0.2 $\mu$ mのフィルター (ゲルマンサイエンス社製) に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

#### 【0104】

実施例11 精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体による、癌細胞及びヒト正常肝実質細胞に対する細胞死誘導活性

実施例10から得られた精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を用いて、大腸癌細胞であるColo205 (ATCC No. CCL-222) に対する細胞死誘導活性を測定した。10% FCSを含むRPMI培地で培養していたColo205細胞を $2.5 \times 10^4$ /mlの濃度に調製し、各ウェル100 $\mu$ lずつを96穴平底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。37°C、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、精製抗体を終濃度10、100、1000ng/mlになるように10 $\mu$ l/ウェルで加え、さらにヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体 (シグマ社製) を終濃度10 $\mu$ g/mlになるように、各ウェルに10 $\mu$ lずつ加えた。陽性コントロールとして、ヒト組換えTRAILタンパク質 (R&D SYSTEMS社製) を終濃度0.1、1、10ng/mlで使用した。陰性コントロールとして、ヒト抗HSA抗体を使用した。37°C、5.0%炭酸ガス下で48時間培養した後、MTS試薬 (Cell Titer 96 AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assay : プロメガ社製) を説明書の方法に従い調製し、各ウェルに20 $\mu$ lずつ添加した。さらに37°C、5.0%炭酸ガス下で2時間培養した後、波長490nm (参照波長630nm

) での吸光度をマイクロプレートリーダー (1420 ARVO マルチラベルカウンター : WALLAC社製) で測定し、ミトコンドリアの還元能を指標として、細胞の生存率を算定した。各ウェルの細胞の生存率は実施例7と同様な式により算出した。

#### 【0105】

次に、実施例10から得られたヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を用いて、HH細胞 (Tissue Transformation Technologies社製) に対する細胞死誘導活性を測定した。まず凍結HH細胞を37℃で融解し、CM5300培地 (CEDRA社製) を用いて $7.5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調製した後に、各ウェル $100\ \mu\text{l}$ ずつをコラーゲンタイプIがコートされている96穴平底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。37℃、5.0%炭酸ガス下で4.5時間培養した後、培地の交換を行った。さらに37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養し、培地を無血清培地 (インシュリン ( $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、シグマ社製) 、グルカゴン ( $7\text{ng}/\text{ml}$ 、シグマ社製) 、ハイドロコルチゾン ( $7.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、シグマ社製) 、ヒトEGF ( $20\text{ng}/\text{ml}$ 、ベクトンディッキンソン社製) 含有DMEM培地 (シグマ社製) ) へ交換した。その後、精製抗体を終濃度 $0.1$ 、 $1$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように $10\ \mu\text{l}$ /ウェルで加え、さらにヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体 (シグマ社製) を終濃度 $10$ 、 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように各ウェルに $10\ \mu\text{l}$ ずつ加えた。陰性コントロールとしてヒト抗HSA抗体を使用した。37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後PBSでHHを2回洗浄し、各ウェルにPBSを $100\ \mu\text{l}$ 加え、さらにTriton X-100を終濃度0.8%になるように $10\ \mu\text{l}$ /ウェルで加えた。37℃で1時間静置し生きているHHを溶解させ、可溶化液 $50\ \mu\text{l}$ /ウェルを異なる96穴平底プレートへ移しLDHアッセイに供した。LDHアッセイ用試薬 (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay : プロメガ社製) を説明書の方法に従い調製し、各ウェルに $50\ \mu\text{l}$ ずつ添加した。プレートを遮光し、室温で1時間静置した後、反応停止液 (1M 酢酸 : プロメガ社製) を $50\ \mu\text{l}$ /ウェルで加え、波長 $492\text{nm}$ での吸光度をマイクロプレートリーダー (1420 ARVO マルチラベルカウンター : WALLAC社製) にて測定した。LDHの酵素活性を指標として、細胞の生存率を算定した。各ウェルの細胞の生存率は実施例7と同様な式により算出した。

#### 【0106】

さらに、算出した生存率を用いて以下の方法でLD50値を計算した。算出した生

存率を縦軸、細胞に添加した抗体の濃度を横軸にとったグラフに、各抗体濃度における生存率をプロットし、プロットした点で隣り合うものを結び曲線を引いた。この曲線を表す式を回帰計算により求め、その式から生存率が50%に該当する抗体濃度を計算し、LD50値とした。

#### 【0107】

結果を図5 a～f並びに表5に示す。図5において、黒丸で実線（—●—）は正常ヒト肝実質細胞を、ひし形で点線（—◆—）はColo205細胞を表わす。表5は、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の大腸癌細胞Colo205、及び正常ヒト肝実質細胞に対する細胞死誘導活性（LD50値）を示す表である。大腸癌細胞Colo205に対するLD50値は、96穴平底プレートの1穴当たり $100\mu\text{l}$ の培地に $2.5 \times 10^3$ の細胞を播種し、翌日精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を細胞に加え、該抗体との反応時間が48時間を経過した時のLD50値である。正常ヒト肝実質細胞に対するLD50値は、96穴平底プレートの1穴当たり $100\mu\text{l}$ の培地に $7.5 \times 10^4$ の正常細胞（ヒト肝細胞）を播種し、翌日精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を正常細胞（ヒト肝細胞）に加え、該抗体との反応時間が24時間を経過した時のLD50値である。精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体は、陰性コントロールと比較して明らかにColo205細胞に細胞死を誘導する活性があることが明らかとなった。さらに、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体E-11-13、L-30-10は、ヒト組換え型TRAILや精製抗体H-48-2と比較して、ヒト正常肝実質細胞に対する毒性が低いことが明らかとなった。

#### 【0108】

ここで、L-30-10は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を肝細胞に添加しても生存率50%以上を示したことから、L-30-10のLD50は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。抗体濃度及び生存率をプロットしたグラフから回帰計算によりLD50を求めたところ、 $24\mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。また、F-4-8は $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ を肝細胞に添加した時点で生存率が50%以下であったことから、F-4-8のLD50は $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である。L-30-10と同様に回帰計算に基づいてLD50を計算した結果、 $0.002\mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。

#### 【0109】

次に、正常ヒト肝細胞のLD50がColo205細胞のLD50の何倍であるか、その比（N

/C比) を求めた。その結果、精製抗体E-11-3はN/C=18.18(10倍以上)、L-30-10はN/C=100(100倍以上)であり、いずれの抗体も有効性及び安全性に優れていることが分かった(表5)。

【表5】

精製ヒト抗TRAIL-R2抗体	正常ヒト肝細胞 LD50 (μg/ml)	Colo205 LD50 (μg/ml)	N/C比
E-11-13	2.8	0.11	25.45
F-4-8	0.002	0.02	0.1
H-48-2	0.12	0.15	0.8
L-30-10	24	0.1	240
W-40-5	7.47	0.7	10.7
ヒト組換え型TRAIL	0.25 ng/ml	2 ng/ml	0.125

【0110】

同様の方法で、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体による細胞死誘導活性

を、U251細胞（神経膠腫由来、理研ジーンバンク No.RCB0461）、Jurkat細胞（T細胞リンパ腫由来、大日本製薬株式会社製）について検討した。U251細胞に対する試験では、96穴平底プレートの1穴あたり $100\mu\text{l}$ の培地に $1.0 \times 10^4$ の細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養し、抗体を翌日添加し、前記環境下に48時間置いた後に細胞の生存率を測定した。Jurkat細胞に対する試験では、96穴平底プレートの1穴あたり $100\mu\text{l}$ の培地に $4.0 \times 10^4$ の細胞を播種し、抗体を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した後に細胞の生存率を測定した。以下、各抗体のLD<sub>50</sub>値（単位は $\mu\text{g/ml}$ ）を示す。

E-11-13のU251細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.3、Jurkat細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.1。

L-30-10のU251細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.17、Jurkat細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.13。

H-48-2のU251細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.24、Jurkat細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.07。

F-4-8のU251細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.03、Jurkat細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.004。

W-40-5のU251細胞に対するLD<sub>50</sub>:1.0、Jurkat細胞に対するLD<sub>50</sub>:0.48。

なお、U251細胞に対しては終濃度 $4\mu\text{g/ml}$ のシスプラチニン注射液（日本化薬株式会社製）を抗体と同時に添加した系でアッセイを行った。

#### 【0111】

実施例12 TRAIL共存下における、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の癌細胞に対する細胞死誘導活性

実施例10から得られた精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体のTRAILに対する影響を、以下に記載する方法に従って検討した。10% FCSを含むRPMI培地で培養していたColo205細胞を $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度に調製し、各ウェル $100\mu\text{l}$ ずつを96穴平底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。37°C、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、精製抗体を終濃度0.1、 $1\mu\text{g/ml}$ になるように $10\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で加えた後、ヒト組換えTRAILタンパク質（R&D SYSTEMS社製）を終濃度1ng/mlになるように $10\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で加えた。精製抗体の陰性コントロールとして、ヒト抗HSA抗体を使用した。37°C、5.0%炭酸ガス下で48時間培養した後、MTS試薬（Cell Titer 96 AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assay：プロメガ社製）を説明書の方法に従い調製し、各ウェルに $20\mu\text{l}$ ずつ添加した。さらに37°C、5.0%炭酸ガス下で2時間培養した後、波長490nm（参照波長630nm）で

の吸光度をマイクロプレートリーダー（1420 ARVO マルチラベルカウンター：WALLAC社製）で測定し、ミトコンドリアの還元能を指標として、細胞の生存率を算定した。各ウェルの細胞の生存率は実施例7と同様な式により計算し、その計算値を用いて死細胞率を算出した。

#### 【0112】

結果を図6a～eに示す。精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体F-4-8、H-4-8-2、W-40-5は、TRAIL共存下においてColo205細胞に対するアポトーシス誘導活性の増強が見られた。一方、図6a、図6bにおいて、抗体を単独で添加した場合にはアポトーシス誘導活性が見られなかったことから、抗体とTRAILが共存した場合のアポトーシス誘導活性はTRAILによりもたらされたものと考えられる。L-30-10はいずれの濃度においてもTRAILのColo205細胞に対するアポトーシス誘導活性に影響を与えたかった。受容体への結合部位がTRAILと異なるか、あるいは受容体への親和性がTRAILよりも低いために、L-30-10はTRAILの受容体への結合を妨げないものと考えられる。E-11-13は終濃度1μg/mlでTRAILのColo205細胞に対するアポトーシス誘導活性を抑制した。

#### 【0113】

実施例13 マウス担癌モデルに対する精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の効果

実施例10から得られたヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の効果を、以下の記載する方法に従ってマウス担癌モデルを用いて検討した。

4週令のBalb/cヌードマウス（日本クレア（株）社より購入）の背部皮下に、大腸癌細胞Colo205を $5 \times 10^6$ /マウス個体で移植した。移植1週間～10日後に、生着した腫瘍の大きさを測定し、腫瘍の大きさが $50 \sim 100\text{mm}^3$ 又は $300\text{mm}^3$ の担癌マウスを5匹1群として群分けした。担癌マウスの腹腔内に、精製抗体 1、4、20、100μg/マウス個体（200μlのPBSに溶解したもの）を投与し、腫瘍の大きさを測定した。抗体の陰性コントロールとして、同量のヒト抗HSA抗体を使用した。

#### 【0114】

以上の実験の結果を図7～9に示す。精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体E-11-13、F-4-8、H-48-2、L-30-10、W-40-5を1μg/マウス個体で投与した群では

、H-48-2に退縮効果が見られ、E-11-13、L-30-10、F-4-8、W-40-5の順で抗腫瘍効果が弱くなっていた(図7)。図7において、3回隔日投与した時に、初回投与時から計算して少なくとも13日間は増殖抑制～退縮効果が観察された(H-48-2クローン)。

### 【0115】

E-11-13を4、20、100 $\mu$ g/マウス個体で投与した群では、投与したマウス全において抗腫瘍効果が確認された。20 $\mu$ g/マウス個体の投与量において最も腫瘍退縮効果が見られた(図8)。図8において、4回隔日投与した時に、初回投与時から計算して少なくとも11日間は増殖抑制～退縮効果が観察された。

さらに、300mm<sup>3</sup>の担癌マウスを5匹1群として、E-11-13を20 $\mu$ g/マウス個体で投与した結果、顕著な腫瘍退縮が観察された(図9)。図9において、3回隔日投与した時に、初回投与時から計算して少なくとも9日間は増殖抑制～退縮効果が観察された。

### 【発明の効果】

本発明により、TRAIL-R1及びR2を発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療薬として有用であり、かつ肝臓への傷害性が回避することができる、極めて安全性の高い分子が提供された。

### 【0116】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> ANTI TRAIL-R ANTIBODY

<130> P01-0743

<150> JP2001-150213

<151> 2001-05-18

<150> JP2001-243040

<151> 2001-08-09

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

cacgaattca ccatggcgcc accaccagct

30

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

tttctcgagg cggccgctta tcactccaag gacacggcag agcctgtg

48

<210> 3  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3  
cacgaattcg ccaccatgga acaacgggga cag 33

<210> 4  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4  
tttctcgagg cggccgctca ttaggacatg gcagagtctg cattacct 48

<210> 5  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

ttctacgagc ggcttatcac agcctcctcc tctgaga

37

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

ttctacgagc ggccgcttat cacaagtctg caaagtcatc

40

【0 1 1 7】

【配列表フリー テキスト】

配列番号 1：合成DNA

配列番号 2：合成DNA

配列番号 3：合成DNA

配列番号 4：合成DNA

配列番号 5：合成DNA

配列番号 6：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒト抗TRAIL-R1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中の  
Colo205に対する細胞死誘導活性を示す図。

【図 2】

ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中の

Colo205に対する細胞死誘導活性を示す図。

【図3】

ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中のColo205に対する細胞死誘導活性を示す図（ヤギ抗ヒトIgG( $\gamma$ )特異的ポリクローナル抗体 非存在下）。

【図4】

ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清中のHUVECに対する細胞死誘導活性を示す図。

【図5】

精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体のColo205及び正常ヒト肝実質細胞に対する細胞死誘導活性を示す図。

【図6】

TRAIL共存下における精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体の活性を示す図。

【図7】

精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体E-11-13、F-4-8、H-48-2、L-30-10、W-40-5を、 $1\mu\text{g}/\text{マウス個体}$ で3回隔日投与したときの腫瘍の大きさを測定した結果を示す図。

【図8】

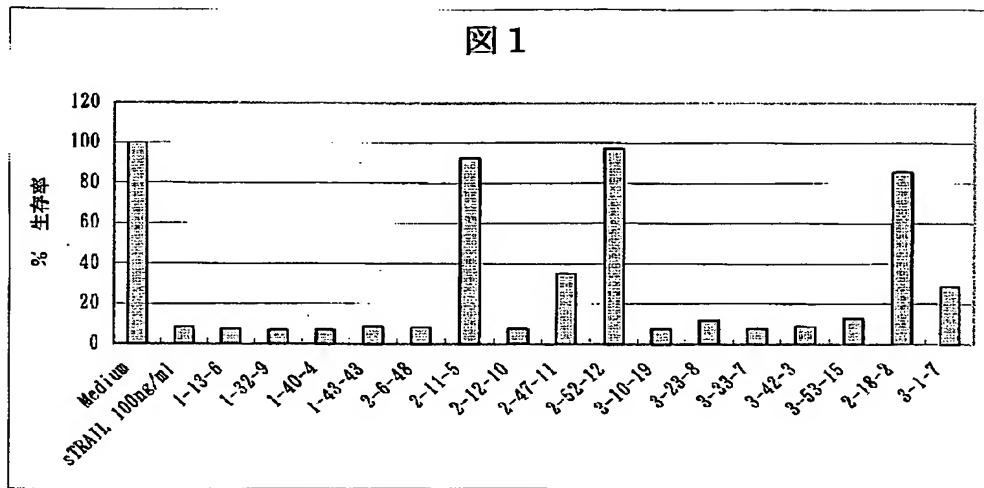
精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体E-11-13を4、20、 $100\mu\text{g}/\text{マウス個体}$ で4回投与したときの腫瘍の大きさを測定した結果を示す図。

【図9】

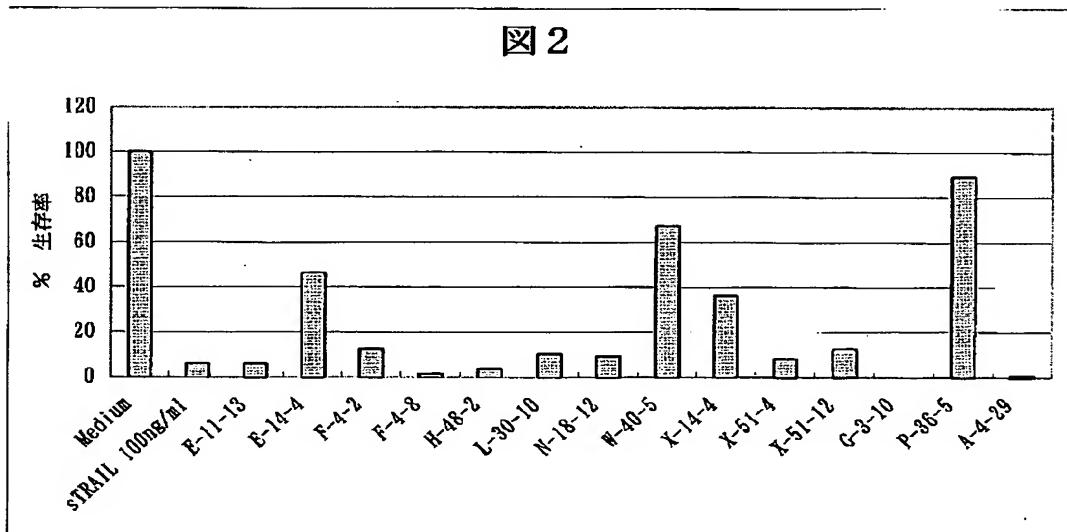
$300\text{mm}^3$ の担癌マウスに対し、精製ヒト抗TRAIL-R2モノクローナル抗体E-11-13を $20\mu\text{g}/\text{マウス個体}$ で3回隔日投与したときの腫瘍の大きさを測定した結果を示す図。

【書類名】 図面

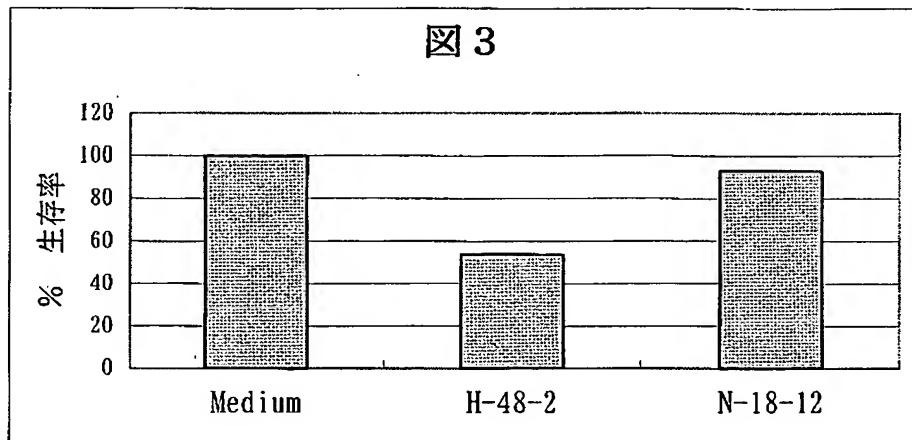
【図1】



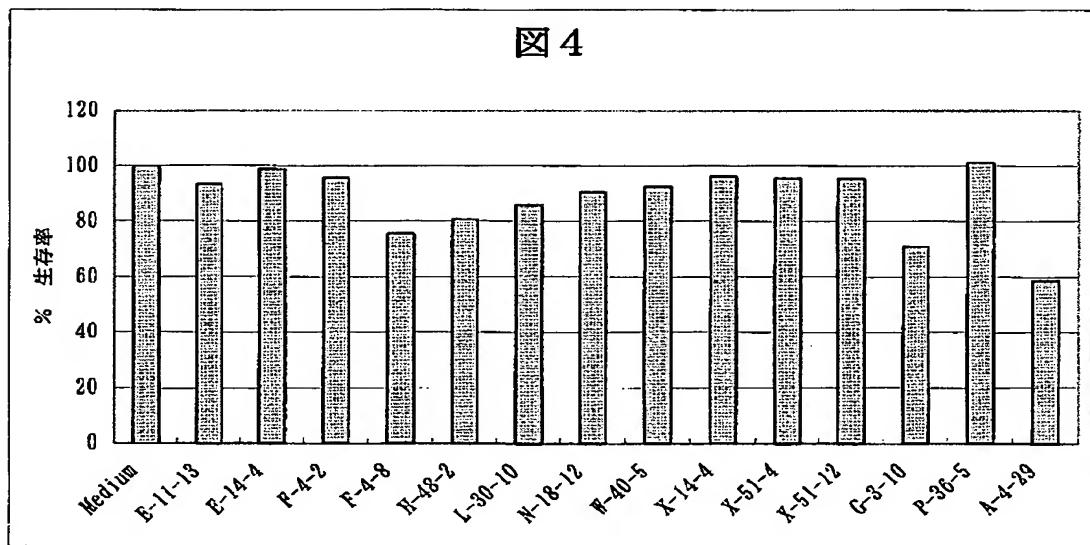
【図2】



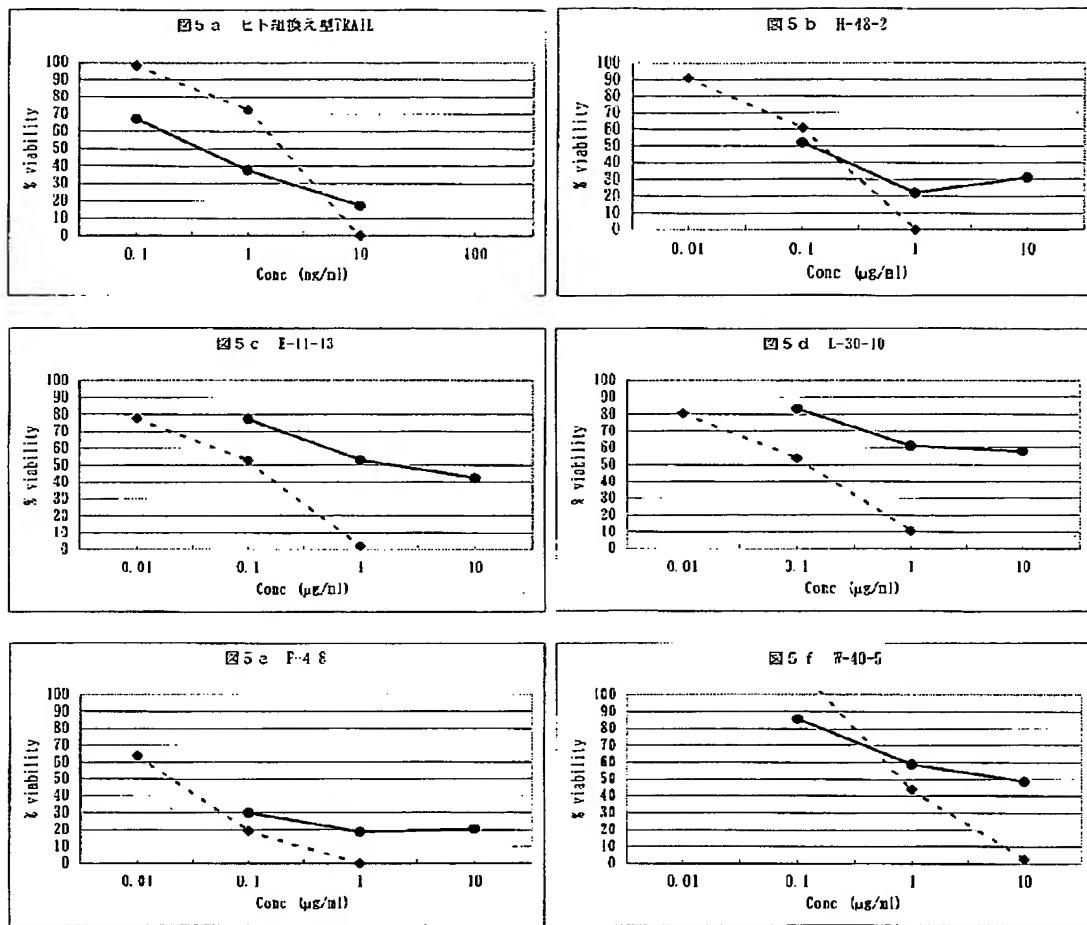
【図3】



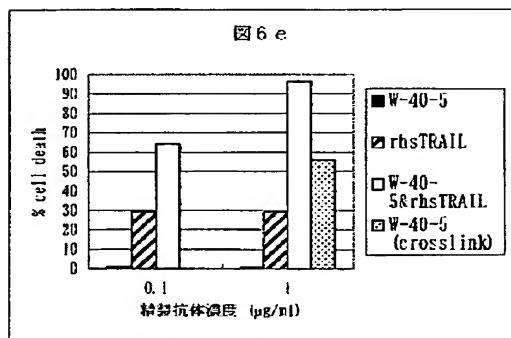
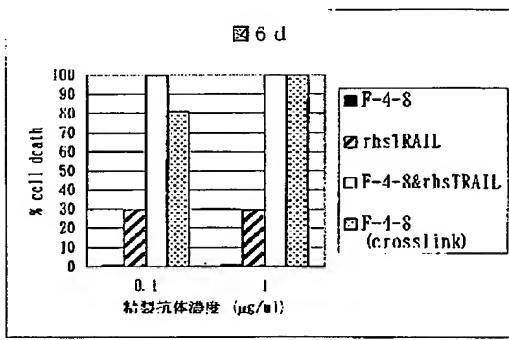
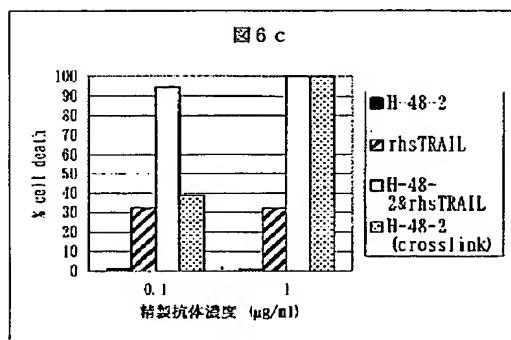
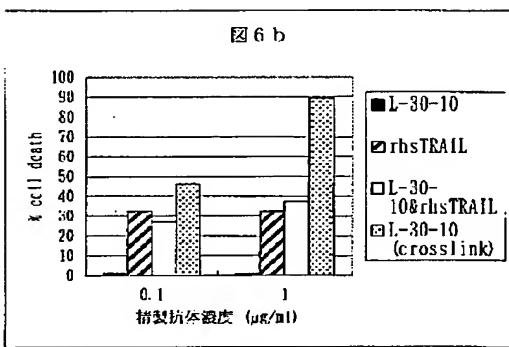
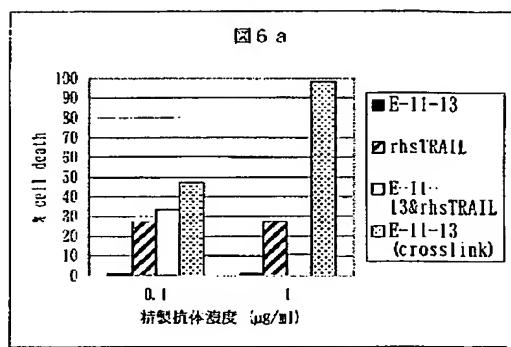
【図4】



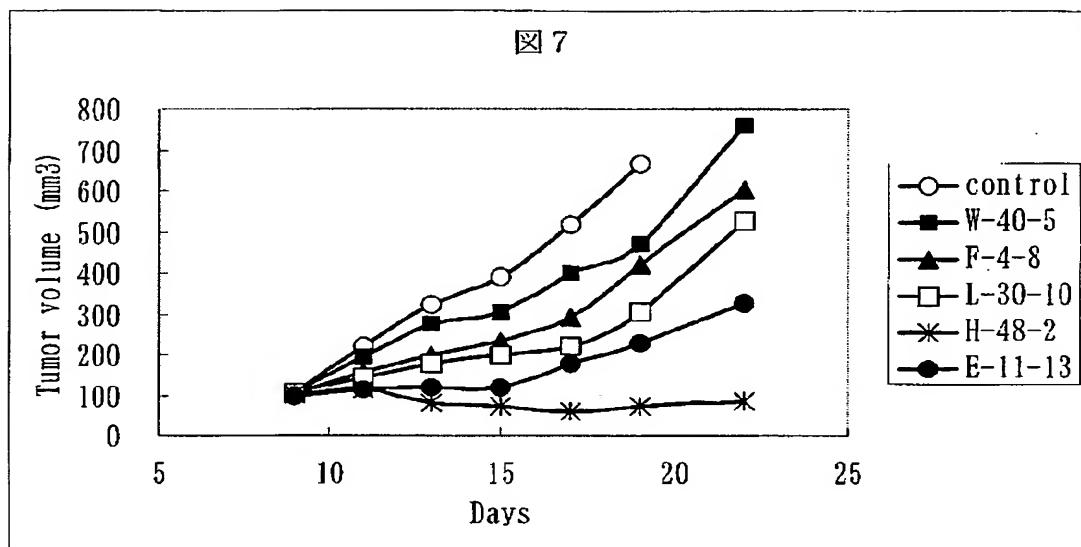
【図5】



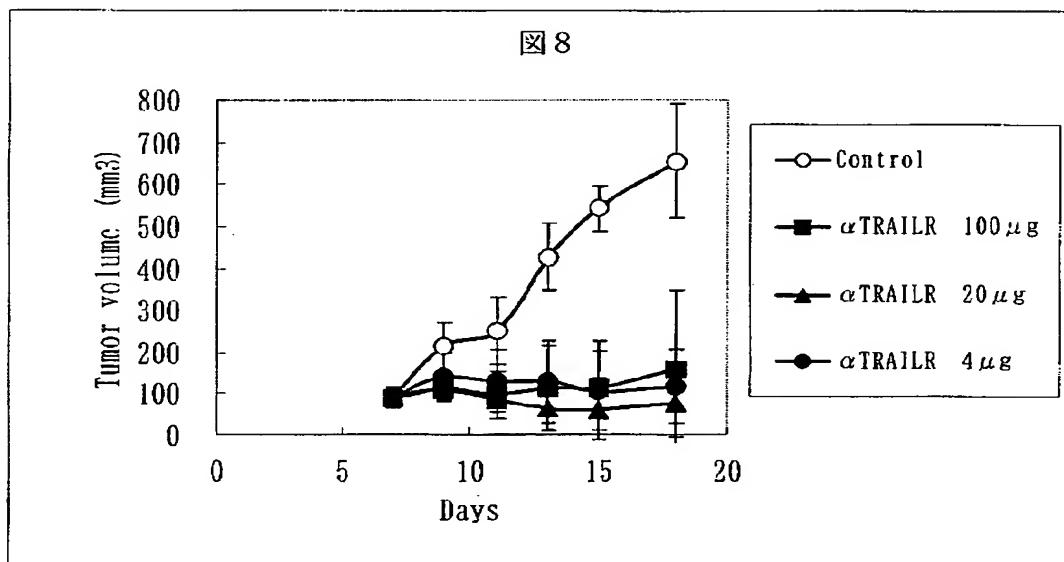
【図6】



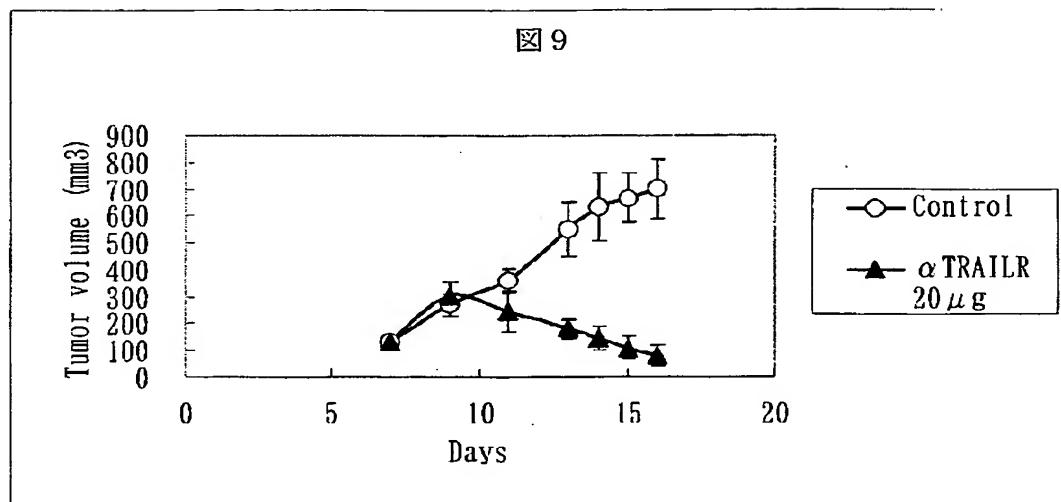
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗TRAIL-R1及びR2モノクローナル抗体の提供。

【解決手段】 以下の(a)～(c) から選ばれる少なくとも 1 つの性質を有する抗TRAIL-R1及びR2抗体又はその機能的断片：(a)TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現している癌細胞にアポトーシスを誘導する活性を有する、(b)TRAIL-R1及び/又はTRAIL-R2を発現しているヒト正常細胞には影響を及ぼさない、並びに(c)ヒト肝臓細胞傷害を誘発しない。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P01-0743

【提出日】 平成14年 4月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2001-314489

【補正をする者】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 森 栄治

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 片岡 之郎

【その他】 誤記の理由は、タイプミスです。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P01-0743

【提出日】 平成14年 5月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2001-314489

【補正をする者】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 森 英治

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 片岡 之郎

【その他】 誤記の理由は、タイプミスです。

【プルーフの要否】 要

特願 2001-314489

## 出願人履歴情報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日 1995年 6月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名 麒麟麦酒株式会社